



**UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA**

PRISCILA CASSOLLA

**ALTERAÇÕES METABÓLICAS NA CAQUEXIA INDUZIDA
POR TUMOR WALKER-256 EM RATOS: ANORMALIDADES DE
PARÂMETROS PLASMÁTICOS E HEPÁTICOS**

Londrina
2008

PRISCILA CASSOLLA

**ALTERAÇÕES METABÓLICAS NA CAQUEXIA INDUZIDA
POR TUMOR WALKER-256 EM RATOS: ANORMALIDADES DE
PARÂMETROS PLASMÁTICOS E HEPÁTICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Patologia.

Orientadora: Profa. Dra. Helenir Medri de Souza

Londrina
2008

**Catálogo na publicação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos
da Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

C345a Cassolla, Priscila.

Alterações metabólicas na caquexia induzida por tumor Walker-256 em ratos : anormalidades de parâmetros plasmáticos e hepáticos/ Priscila Cassolla. – Londrina, 2008.
99f.

Orientador: Helenir Medri de Souza.

Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2008.

Bibliografia: f.88-99.

1. Patologia experimental – Teses. 2. Caquexia – Patologia experimental – Teses. 3. Desnutrição – Patologia experimental – Teses. 4. Câncer – Patologia experimental – Teses. I. Souza, Helenir Medri de. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. III. Título.

CDU 579.26

PRISCILA CASSOLLA

**ALTERAÇÕES METABÓLICAS NA CAQUEXIA INDUZIDA
POR TUMOR WALKER-256 EM RATOS: ANORMALIDADES DE
PARÂMETROS PLASMÁTICOS E HEPÁTICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Patologia.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Helenir Medri de Souza
Universidade Estadual de Londrina

Prof. Dr. Roberto Barbosa Bazotte
Universidade Estadual de Maringá

Profa. Dra. Cássia Thaís Bussamra Vieira Zaia
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, 26 de fevereiro de 2008

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Lourdes e Edison, que são um exemplo de força, determinação e humildade.

À Helenir, mais que orientadora, considero-a como minha segunda mãe.

AGRADECIMENTOS

À Deus, acima de tudo.

Ao meu querido pai, Edison Cassolla (Véio), que sempre me apoiou em relação aos estudos e que agora começou a compreender a minha opção profissional.

À minha mãe, Lourdes Yoko Daikuhara Cassolla (mamis), que esteve disposta a me ajudar o tempo todo, sua prestatividade foi ímpar para atingir meus objetivos.

Às minhas irmãs Patrícia Cassolla (Zá), Poliane Cassolla (Zolinha) e Penélope Cassolla (Zê), que são pessoas em quem eu confio, pelo apoio e também pelas críticas. Cresci muito com vocês.

Aos meus familiares, pela compreensão da minha correria no dia-a-dia e das minhas ausências nas reuniões de família. Vocês são muito importantes pra mim.

À minha inspiração profissional e pessoal, Prof^ª Dr^ª Helenir Medri de Souza, tão cuidadosa e dedicada, ensinou-me com paciência e sabedoria cada passo da pesquisa, da burocracia - passando pelos experimentos - à escrita. Não há palavras suficientes para demonstrar a minha gratidão por tudo o que você fez (e ainda faz) por mim.

À Prof^ª Dr^ª Glaucia Regina Borba Murad, que não mediu esforços para me auxiliar desde a bancada aos conselhos pessoais, exemplo de respeito e profissionalismo.

À Prof^ª Dr^ª Cássia Thaís Bussamra Vieira Zaia e ao Prof. Dr. Dimas Augusto Morozin Zaia, não só pela loucura da dosagem de ácidos graxos livres, mas também pela amizade e pela disposição em ajudar.

Ao Prof. Dr. Luís Carlos Carvalho Navegantes, que deu a brilhante sugestão de fazer o grupo controle *pair fed*, contribuindo para o enriquecimento deste trabalho.

Aos integrantes do Grupo de Pesquisa da Caquexia da UEL, que se esforçaram para uma integração multidisciplinar, ampliando os meus conhecimentos, em especial ao Prof. Dr. Rubens Cecchini, por ter convidado o Laboratório de Fisiologia Metabólica para participar do grupo.

Aos docentes do Programa de Pós-graduação em Patologia Experimental, pela cumprida tarefa de ensinar.

À Prof^a Dr^a Maria Angélica Ehara Watanabe, atual coordenadora do Programa de Pós-graduação em Patologia Experimental, pela amizade, competência, e por ser tão prestativa e prática na resolução dos problemas.

Aos funcionários dos Departamentos de Ciências Patológicas e Fisiológicas, em especial à Vânia Darc de Castro – secretária da Pós-graduação do Depto de Ciências Patológicas, à Ana Maria Rodrigues – secretária do Depto de Ciências Patológicas, à Daniela Grosso Borin – secretária do Depto de Ciências Fisiológicas e aos técnicos do Depto de Ciências Fisiológicas.

Aos estagiários e agregados do Laboratório de Fisiologia Metabólica, Sayonara R. Oliveira (Sá), Ana Paula S. Dornellas (Aninha), Suéllen K. F. Vilas Boas (Suka), Camilla Y. Kawanishi (Prima), Thaís F. Liboni (Thá), Rafael E. Pedro (Rafa), João Carlos T. Silva Filho e Wesley F. de Mello, que foram de muita ajuda na execução das tarefas e que me propiciaram, além de muitos risos, a oportunidade de ensiná-los e de, raramente, exercitar a minha paciência.

Aos meus queridos amigos Adriane F. Evangelista (Feijão), Marcela Y. Ogo (Marcelitcha), Andréa C. Koishi (Ander), Tatiane V. Machado (TatE), Milton C. Gobbo (MiRtinho), Paulo D. A. Torres (Kbça), Denise H. Kitamura (Deee), Thiago Y. C. Massuda (Trankera), Érica A. Kavati (Eriquinha), Alexandre A. Sasaki (Sasaki), Juliana T. T. Fritzen (Ju) e Tatiane F. Petroni (Tati), os quais me ajudaram inúmeras vezes em termos acadêmicos e/ou de descontração, vocês são especiais pra mim.

À minha turma de mestrado, Aida Mehanna, Alissana E. I. Camargo, Débora F. V. Rodrigues, Josiane Mendes, Patrícia S. Suzuki, Rosália H. F. Vivan e Vânia A. M. Terra, pelo aprendizado em conjunto e pelos ótimos momentos compartilhados.

À CAPES, pela concessão da bolsa, possibilitando minha permanência no mestrado.

*"O que você sabe não vale nada,
o único valor está no que você
faz com aquilo que sabe".*

Provérbio Kung-Fu

CASSOLLA, PRISCILA. **Alterações metabólicas na caquexia induzida por tumor Walker-256 em ratos**: anormalidades de parâmetros plasmáticos e hepáticos. 2008. 95f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

RESUMO

A caquexia, síndrome associada à perda de peso e redução da ingestão de alimentos, ocorre em muitas doenças crônicas como o câncer e é importante causa de morbidade e mortalidade. Relativamente pouco é conhecido sobre as alterações metabólicas na caquexia, suas causas e tratamento. O objetivo do presente estudo foi o estabelecimento do modelo de caquexia induzida por tumor Walker-256 em ratos e a caracterização do perfil metabólico plasmático e hepático nesta condição. Para a implantação do tumor, células Walker-256 foram injetadas subcutaneamente no flanco direito traseiro de ratos machos Wistar na concentração de 8×10^7 células/animal. No 5º, 8º, 11º e 14º dia após a inoculação das células avaliou-se as massas corporal, tumoral e do músculo gastrocnêmio, a ingestão alimentar, o conteúdo de glicogênio hepático e a concentração de vários parâmetros plasmáticos (colesterol, triacilgliceróis, ácidos graxos livres, glicerol, lactato, uréia e glicose). A maioria das análises também foi feita em animais submetidos a um esquema de alimentação reduzida (animais controle *pair fed*), semelhante a dos animais com tumor portadores de anorexia, ou em animais controles com alimentação *ad libitum*. Foram também avaliados, no 12º dia de desenvolvimento tumoral, a neoglicogênese e o consumo de oxigênio hepáticos a partir de vários precursores de glicose (alanina 2,5 mM, piruvato 5 mM, lactato 2 e 8 mM e glicerol 2 mM) em estudos de perfusão de fígado *in situ*. Nestes experimentos os animais portadores de tumor e seus controles foram submetidos a 24 horas de privação alimentar. Todos os dados obtidos foram testados quanto à distribuição e homogeneidade das variâncias e testes estatísticos adequados foram empregados para análise dos resultados. De uma forma geral, especialmente no 14º dia após a inoculação das células Walker-256, os animais portadores do tumor apresentaram: a) redução ($p < 0,05$) da massa corpórea e perda de massa muscular; b) redução ($p < 0,05$) da ingestão alimentar, glicemia e do conteúdo de glicogênio hepático; c) aumento ($p < 0,05$) dos triacilgliceróis, ácidos graxos livres, lactato e uréia plasmáticos e d) não alteração ($p > 0,05$) no colesterol e glicerol plasmático. Estas alterações não ocorreram nos animais controle *pair fed*, exceto a glicemia e o conteúdo de glicogênio hepático, e em sua maioria acompanhou o aumento progressivo da massa tumoral. Adicionalmente, houve inibição ($p < 0,05$) da neoglicogênese e do consumo de oxigênio hepáticos nos animais portadores de tumor (12º dia) quando os precursores utilizados foram a alanina, o piruvato ou o lactato 2 mM, mas não ($p > 0,05$) o glicerol ou o lactato 8 mM. Os resultados indicam que, além dos sinais característicos da síndrome da caquexia como emagrecimento, catabolismo muscular e anorexia, os animais portadores de tumor Walker-256 apresentam várias alterações metabólicas plasmáticas e hepáticas, algumas das quais se iniciam já no 5º dia após a inoculação das células tumorais, e são acentuadas no decorrer do desenvolvimento do processo caquético. As evidências de que as alterações do perfil metabólico dos animais portadores de tumor não foram encontradas nos animais controle *pair fed* indicam que as mesmas não são decorrentes da menor ingestão alimentar. Estas alterações, e também as observadas na neoglicogênese, provavelmente, são mediadas por fatores produzidos pelo tumor ou pelo hospedeiro (citocinas) em resposta à presença do tumor.

Palavras-chave: Caquexia. Câncer. Alterações metabólicas. Colesterol. Triacilgliceróis. Ácidos graxos. Glicerol. Lactato. Uréia. Glicemia. Glicogênio hepático. Neoglicogênese hepática.

CASSOLLA, PRISCILA. **Metabolic alterations in the Walker-256 tumor-induced cachexia in rats**: abnormality of plasmatic and hepatic parameters. 2008. 95p. Dissertation (Mater's degree in Experimental Pathology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

ABSTRACT

Cachexia, syndrome associated with loss of weight and reduction in food intake, occurs in many chronic diseases, as cancer, and it is an important cause of morbidity and mortality. Relatively little is known about metabolic alterations in cachexia, its causes and treatment. The present study's objective was the establishment of a model of Walker-256 tumor-induced cachexia in rats and the characterization of plasmatic and hepatic metabolic profile in this condition. For tumor implantation, Walker-256 cells were injected subcutaneously into the back right flank of Wistar male rats at concentration of 8×10^7 cells/animal. On the 5th, 8th, 11th and 14th day post-inoculation of cells, corporal, tumoral and gastrocnemius muscle masses, food intake, content of hepatic glycogen and concentration of several plasmatic parameters (cholesterol, triacylglycerols, free fatty acids, glycerol, lactate, urea and glucose) were evaluated. Most of the analyses also were made in animals submitted to a scheme of reduced feeding (*pair fed* control animal), like anorexia-bearing animals with tumor, or in controls with feeding *ad libitum*. In addition, on 12th day of tumoral development, the hepatic gluconeogenesis and oxygen uptake from several precursors of glucose (alanine 2,5 mM, pyruvate 5 mM, lactate 2 e 8 mM e glycerol 2 mM) *in situ* liver perfusion studies were evaluated. In these experiments the tumor-bearing animals and its controls were submitted to 24 hours of alimentary privation. All obtained data were tested in respect distribution and variances homogeneity and suitable statistical tests were employed to analyse the results. In general, especially on 14th day post-inoculation of Walker-256 cells, the tumor-bearing animals presented: a) reduction ($p < 0,05$) of corporal mass and loss of muscular mass; b) reduction ($p < 0,05$) of food intake, glycemia and content of hepatic glycogen; c) increased ($p < 0,05$) plasmatic triacylglycerols, free fatty acids, lactate and urea and d) no change ($p > 0,05$) in plasmatic cholesterol and glycerol. These changes did not occur in *pair fed* control animals, except the glycemia and the content of hepatic glycogen, and in its majority it followed the gradual increase of the tumoral mass. Additionally, there was inhibition ($p < 0,05$) of hepatic gluconeogenesis and oxygen uptake in the tumor-bearing animals (12th day) when the precursors used were alanine, pyruvate or lactate 2 mM, but not ($p > 0,05$) the glycerol or lactate 8 mM. The results indicates that, beyond of characteristic signals of the cachexia syndrome such as weakning, muscular catabolism and anorexia, the Walker-256 tumor-bearing animals presented several plasmatic and hepatic metabolic alterations, some of which were already initiated on the 5th day post-inoculation of tumoral cells, and were accentuated during the development of cachectic process. The evidences that the alterations of the metabolic profile of tumor-bearing animals were not found in *pair fed* control animals indicates that they aren't deccurrent of lower food intake. These alterations, and also the ones observed on gluconeogenesis, probably, are mediated by factors produced by the tumor or the host (cytokines) in reply to the presence of tumor.

Keywords: Cachexia. Cancer. Metabolic alterations. Cholesterol. Triacylglycerols. Free fatty acids. Glycerol. Lactate. Urea. Glycemia. Hepatic glycogen. Hepatic gluconeogenesis.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Concentrações de colesterol plasmático de ratos controle, controle *pair fed* e portadores de tumor Walker-256 no 5º, 8º, 11º e 14º dias após a inoculação das células tumorais49
- Figura 2** – Concentrações de triacilgliceróis plasmático de ratos controle, controle *pair fed* e portadores de tumor Walker-256 no 5º, 8º, 11º e 14º dias após a inoculação das células tumorais50
- Figura 3** – Concentrações de ácidos graxos livres plasmático de ratos controle, controle *pair fed* e portadores de tumor Walker-256 no 5º, 8º, 11º e 14º dias após a inoculação das células tumorais51
- Figura 4** – Concentrações de glicerol plasmático de ratos controle, controle *pair fed* e portadores de tumor Walker-256 no 5º, 8º, 11º e 14º dias após a inoculação das células tumorais52
- Figura 5** – Concentrações de lactato plasmático de ratos controle, controle *pair fed* e portadores de tumor Walker-256 no 5º, 8º, 11º e 14º dias após a inoculação das células tumorais53
- Figura 6** – Concentrações de uréia plasmática de ratos controle, controle *pair fed* e portadores de tumor Walker-256 no 5º, 8º, 11º e 14º dias após a inoculação das células tumorais54
- Figura 7** – Glicemia de ratos controle, controle *pair fed* e portadores de tumor Walker-256 no 5º, 8º, 11º e 14º dias após a inoculação das células tumorais55
- Figura 8** – Percentagem de conteúdo de glicogênio hepático em relação ao controle de ratos controle *pair fed* e portadores de tumor Walker-256 no 5º, 8º, 11º e 14º dias após a inoculação das células tumorais56
- Figura 9** – Produção de glicose, consumo de oxigênio e as respectivas áreas sob as curvas (AUCs) (B e D) em fígados de ratos portadores de tumor Walker-256 (WK) e controles durante a infusão de L-alanina.....59

Figura 10 – Produções hepáticas de uréia, piruvato e lactato e as respectivas áreas sob as curvas em ratos portadores de tumor Walker-256 (WK) e controles durante a infusão de L-alanina	60
Figura 11 – Produção de glicose, consumo de oxigênio e as respectivas áreas sob as curvas (AUCs) em fígados de ratos portadores de tumor Walker-256 (WK) e controles durante a infusão de piruvato	61
Figura 12 – Produção de glicose, consumo de oxigênio e as respectivas áreas sob as curvas (AUCs) em fígados de ratos portadores de tumor Walker-256 (WK) e controles durante a infusão de L-lactato	62
Figura 13 – Produção de glicose, consumo de oxigênio e as respectivas áreas sob as curvas (AUCs) (em fígados de ratos portadores de tumor Walker-256 (WK) e controles durante a infusão de L-lactato	63
Figura 14 – Produção de glicose, consumo de oxigênio e as respectivas áreas sob as curvas (AUCs) em fígados de ratos portadores de tumor Walker-256 (WK) e controles durante a infusão de glicerol	64
Figura 15 – Neoglicogênese pelos precursores alanina, piruvato, lactato e glicerol, e as principais enzimas que regulam a via	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	10 ⁻⁶ grama
µmol	10 ⁻⁶ mol
1,3-DPGA	1,3-difosfoglicerato
2-PGA	2-fosfoglicerato
3-PGA	3-fosfoglicerato
4-AAP	4-aminoantipirina
4-AF	4-aminofenazona
ADP	Adenosina difosfato
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
AKT	Proteína quinase B
AMP	Adenosina monofosfato
AMPc	Adenosina monofosfato cíclica
AMPK	Proteína quinase dependente de AMP
ANOVA	Análise de Variância Unidimensional
Anti-(IFN-γ)	Anticorpo anti-interferon-γ
Anti-(IL-6)	Anticorpo anti-interleucina-6
ATP	Adenosina trifosfato
AUC	Área sob a curva
Ca⁺²	Íon cálcio
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CAT	Carnitina acil transferase
CE	Colesterol esterase
CO	Colesterol oxidase
CO₂	Dióxido de carbono
CoA	Coenzima A
CPT	Carnitina palmitoil transferase
CRF	Fator liberador de corticotropina
DHAP	Dihidroxiacetona fosfato
DHBS	3,5-dicloro-2-hidroxibenzenosulfonato

dL	10 ⁻¹ litro
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EPAs	Ácidos graxos poliinsaturados
ERK	Quinase relacionada com sinal extracelular
Fru-1,6-P₂	Frutose-1,6-bifosfato
Fru-6-P	Frutose-6-fosfato
g	Gramma
GAP	Gliceraldeído 3-fosfato
Gli-6-P	Glicose-6-fosfato
Glicerol-P	Glicerol-fosfato
GLUT-1	Transportador de glicose-1
GLUT-3	Transportador de glicose-3
GLUT4	Transportador de glicose-4
gmc	Ganho de massa corpórea do grupo controle
GMPc	Guanosina monofosfato cíclica
GPO	Glicerol-1-fosfato oxidase
H⁺	Íon hidrogênio
H₂O	Água
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
H₂SO₄	Ácido sulfúrico
HIF	Fator induzido por hipóxia
HMG-CoA redutase	3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA redutase
HSL	Lipase hormônio-sensível
IκB	Inibidor de κB
IκBα	Inibidor de κB-α
IFN-α	Interferon-α
IFN-γ	Interferon-γ
IKK-β	Quinase inibitória de κB-β
IL-1	Interleucina-1
IL-1α	Interleucina-1α
IL-1β	Interleucina-1β
IL-12	Interleucina-12

IL-6	Interleucina-6
IRS-1	Substrato do receptor de insulina-1
KCl	Cloreto de potássio
Kg	10 ³ grama
KH	Tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato
LDH	Lactato desidrogenase
LMF	Fator mobilizador de lipídeos
LPL	Lipoproteína lipase
MAFbx	Atrofia de músculo F-box
Mal	Malato
MCA	Sarcoma murino A
MCG	Sarcoma murino G
MEK	Proteína quinase ativada por mitógeno
mfe	Massa corpórea final do animal com tumor
mg	10 ⁻³ grama
mie	Massa corpórea inicial do animal com tumor
min	Minuto
mL	10 ⁻³ litro
mm	10 ⁻³ metros
mM	10 ⁻³ molar
mmg	Massa do músculo gastrocnêmio em grama
mmgc	Massa do músculo gastrocnêmio em g%
mt	Massa do tumor
MuRF1	Proteína do músculo do dedo anelar-1
n	Número amostral
N₂	Nitrogênio molecular
Na⁺	Íon sódio
NaCl	Cloreto de sódio
NaClO	Hipoclorito de sódio
NAD⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma oxidada)
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)
NaOH	Hidróxido de sódio

NF-κB	Fator nuclear κ B
NH₂Cl	Monocloroamino
NH₃	Amônia
NHE-1	Lançadeira Na ⁺ /H ⁺ -1
NHE-6	Lançadeira Na ⁺ /H ⁺ -6
nm	10 ⁻⁹ metro
NO	Óxido nítrico
NPY	Neuropeptídeo Y
O₂	Oxigênio molecular
OAA	Oxaloacetato
°C	Graus Celsius
PBS	Salina tamponada com fosfato
PEP	Fosfoenolpiruvato
PEPCK	Fosfoenolpiruvatocarboxiquinase
PGE2	Prostaglandina E2
pH	Potencial hidrogeniônico
PI3K	Proteína quinase-3
PIF	Fator indutor de proteólise
PKB	Proteína quinase B
PKC-δ	Proteína quinase C- δ
POD	Peroxidase
RNA_m	Ácido ribonucléico mensageiro
ROS	Espécies reativas do oxigênio
SOCS-3	Proteína supressora da sinalização de citocinas-3
TNF-α	Fator de necrose tumoral- α
TNFR1	Receptor de TNF-1
UEM	Universidade Estadual de Maringá
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade
WK	Walker-256
ZAG	Proteína α -2 zínica

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 CAQUEXIA ASSOCIADA AO CÂNCER	18
1.2 ALTERAÇÕES NO METABOLISMO DE LIPÍDEOS NA CAQUEXIA ASSOCIADA AO CÂNCER.....	19
1.3 ALTERAÇÕES NO METABOLISMO DE PROTEÍNAS NA CAQUEXIA ASSOCIADA AO CÂNCER.....	23
1.4 ALTERAÇÕES NO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS NA CAQUEXIA ASSOCIADA AO CÂNCER	26
2 OBJETIVOS	32
2.1 OBJETIVO GERAL	32
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
3 MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1 REAGENTES	34
3.2 ANIMAIS	34
3.3 IMPLANTAÇÃO DO TUMOR WALKER-256	35
3.4 EXPERIMENTOS PARA CARACTERIZAÇÃO DA CAQUEXIA EM RATOS PORTADORES DE TUMOR WALKER-256 E AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS RELACIONADOS	36
3.5 EXPERIMENTOS PARA AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES METABÓLICAS DE PARÂMETROS PLASMÁTICOS E DO CONTEÚDO DE GLICOGÊNIO HEPÁTICO	37
3.6 EXPERIMENTOS DE PERFUSÃO DE FÍGADO <i>IN SITU</i> PARA AVALIAÇÃO DA NEOGLICOGÊNESE E DO CONSUMO DE OXIGÊNIO HEPÁTICOS	37
3.7 PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS	40
3.7.1 Determinação da concentração de colesterol total.....	40
3.7.2 Determinação da concentração de triacilgliceróis	40
3.7.3 Determinação da concentração de ácidos graxos livres	41
3.7.4 Determinação da concentração de glicerol	41
3.7.5 Determinação da concentração de lactato	42
3.7.6 Determinação da concentração de piruvato	42

3.7.7 Determinação da concentração de uréia.....	43
3.7.8 Determinação da concentração de glicose.....	43
3.7.9 Determinação da concentração de glicogênio hepático	44
3.7.10 Determinação do consumo de oxigênio hepático	44
3.8 PROCEDIMENTOS ESTATÍSTICOS	45
4 RESULTADOS	47
4.1 CARACTERIZAÇÃO DA CAQUEXIA EM RATOS PORTADORES DE TUMOR WALKER-256 E AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS RELACIONADOS.....	47
4.2 AVALIAÇÃO DOS LIPÍDEOS PLASMÁTICOS	48
4.3 AVALIAÇÃO DE PRECURSORES NEOGLICOGÊNICOS PLASMÁTICOS	51
4.4 AVALIAÇÃO DA UREMIA	53
4.5 AVALIAÇÃO DA GLICEMIA	54
4.6 AVALIAÇÃO DO CONTEÚDO DE GLICOGÊNIO HEPÁTICO	55
4.7 AVALIAÇÃO DA NEOGLICOGÊNESE HEPÁTICA E DO CONSUMO DE OXIGÊNIO A PARTIR DE VÁRIOS PRECURSORES DE GLICOSE.....	56
5 DISCUSSÃO	66
6 CONCLUSÕES	82
REFERÊNCIAS	85

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 CAQUEXIA ASSOCIADA AO CÂNCER

Algumas situações patológicas são capazes de provocar mudanças no metabolismo energético. É o caso da caquexia, presente em muitas doenças crônicas, tais como câncer, AIDS, insuficiência cardíaca crônica, artrite reumatóide, falência pulmonar crônica, cirrose hepática, deficiência renal e sepse (MARTIGNONI *et al.*, 2003; PLATA-SALAMÁN, 2000).

A caquexia (do grego *kako's*, má; e *'hexis*, condição) é uma síndrome complexa e multifatorial, caracterizada pela diminuição involuntária do peso corpóreo, decorrente da redução da ingestão de alimentos e principalmente da perda de tecido adiposo e massa muscular (INUI, 1999; TISDALE, 1997, 1999, 2000, 2002, 2004; VICENTINO *et al.*, 2002a).

As alterações observadas na caquexia são multidimensionais e altamente coordenadas. A mais evidente é uma redistribuição do conteúdo protéico do corpo, com depleção preferencial do músculo esquelético e aumento na síntese de proteínas envolvidas na resposta de fase aguda (KOTLER, 2000).

Estudos de revisão relatam que a incidência da caquexia associada ao câncer varia pelo tipo de tumor, apresentando-se com as seguintes freqüências: alta (83% a 87%) em pacientes com câncer pancreático e gástrico; intermediária (48% a 61%) em pacientes com câncer de cólon, próstata e pulmão; e baixa (31% a 40%) em pacientes com câncer de mama, sarcomas e leucemia (LOBERG *et al.*, 2007; TISDALE, 1999). De um modo geral, cerca de 20% das mortes de portadores de câncer são atribuídas à caquexia, com a morte ocorrendo tipicamente quando a perda de peso é de aproximadamente 30% (LOBERG *et al.*, 2007).

Os mecanismos que influenciam o desenvolvimento da caquexia do câncer incluem, entre outros, a dinâmica da resposta do hospedeiro (ativação da resposta inflamatória sistêmica e mudanças metabólicas, imunológicas e neuroendócrinas) e as características do tumor e/ou dos produtos derivados do tumor (ARIAS *et al.*, 2007; TISDALE, 2005).

Sugere-se que fatores produzidos pelo tumor e pelo tecido do hospedeiro, na presença de certos tumores, desempenham papel importante na redução da massa tecidual e, por esta razão, são chamados de mediadores da caquexia. Dentre estes fatores, encontram-se citocinas, fator mobilizador de lipídeos (LMF/ZAG), fator indutor de proteólise (PIF), hormônios catabólicos, neuropeptídeos, neurotransmissores e toxormônios (LOBERG *et al.*, 2007; RAMOS *et al.*, 2004; RUBIN, 2003; TISDALE, 1999, 2003).

Os mediadores da caquexia atuam em múltiplos alvos, como adipócitos, miócitos, hepatócitos, medula óssea, células endoteliais e neurônios, induzindo uma complexa cascata de respostas biológicas que culminam em progressiva perda de peso, anorexia, anemia, astenia, depleção de estoque de lipídeos, severa perda protéica do músculo esquelético (LOBERG *et al.*, 2007) e várias outras alterações no metabolismo de lipídeos, proteínas e carboidratos.

1.2 ALTERAÇÕES NO METABOLISMO DE LIPÍDEOS NA CAQUEXIA ASSOCIADA AO CÂNCER

A gordura constitui 90% das reservas energéticas de um adulto, e o aumento da mobilização de massa adiposa é uma das características da caquexia no câncer para suprir a alta demanda energética do tumor (TISDALE, 1997, 2000). Os estudos demonstram que 85% dos lipídios contidos no tecido adiposo podem ser oxidados durante o processo caquético (FEARON, 1992; TISDALE, 2003) pelo aumento da lipólise e/ou pela redução da lipogênese (TISDALE, 2003).

Segundo Tisdale (1999), pacientes com câncer e perda de peso possuem um *turnover* (reciclagem) de ácidos graxos e glicerol elevado quando comparados com sujeitos saudáveis ou pacientes com câncer sem perda de peso. O aumento do gasto energético de repouso, encontrado na caquexia, pode explicar a elevada oxidação lipídica que ocorre no portador de tumor (VICENTINO *et al.*, 2002a).

Para serem oxidados, os ácidos graxos do citoplasma precisam atravessar as membranas externas e internas da mitocôndria. Ainda no citoplasma, os ácidos graxos são ativados, recebendo uma coenzima A (CoA) e tornando-se acil-CoA numa reação catalisada pela enzima acil-CoA sintetase (GROFF *et al.*,

1995). A acil-CoA atravessa a membrana mitocondrial interna por meio de um processo dependente de carnitina e das enzimas carnitina acil transferase I (CAT I), localizada na face externa desta membrana, carnitina acil transferase II (CAT II), localizada na face interna e carnitina-acilcarnitina translocase, que atua entre as duas faces da membrana interna. As duas primeiras enzimas são também denominadas carnitina palmitoil transferase I e II (CPT I e II), devido ao fato do ácido palmítico ser o principal ácido graxo metabolizado (CURI *et al.*, 2002).

Variações na atividade das CATs no câncer não estão bem definidas. Vicentino *et al.* (2002a) observaram redução de aproximadamente 50% na atividade da CAT I mitocondrial nos fígados de ratos em jejum portadores de tumor Walker-256, o que acarretou em diminuição da cetogênese a partir de ácidos graxos exógenos (palmitato, estearato e oleato). Embora, nestes mesmos estudos (VICENTINO *et al.*, 2002a) foram mostradas apenas pequenas variações na atividade da CAT II, aumentando, quando o oleoil-CoA foi o substrato e diminuindo quando o substrato foi o estearoil-CoA, Seelaender *et al.* (1998) mostraram que o componente inibido na presença de tumor maligno, como o Walker-256, é a CAT II. O controle da expressão da CAT II em fígado de ratos portadores de tumor parece ser modulado, dentre outros fatores, pela prostaglandina E2 (PGE2) (SEELAENDER *et al.*, 1998), a qual está associada com a proliferação de células tumorais por inibir a apoptose e por promover a angiogênese (MUND *et al.*, 2007).

Com a menor atividade das CATs no fígado, há redução da oxidação lipídica no hepatócito, o que pode contribuir para o acúmulo de lipídeos na circulação observado em portadores de tumor (VICENTINO *et al.*, 2002a), ainda que eles sejam oxidados em outros tecidos (DELARUE; MAGNAN, 2007).

Adicionalmente, a elevação da concentração plasmática de ácidos graxos e triacilgliceróis em pacientes caquéticos com câncer tem sido freqüentemente relacionada com o envolvimento de citocinas (TISDALE, 1999).

As citocinas são produzidas, principalmente, por células do sistema imune em resposta a um desafio antigênico. Na primeira linha de defesa encontram-se os macrófagos que, quando ativados, sintetizam e liberam grandes quantidades de espécies reativas de oxigênio (ROS) e citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6), interferon- α (IFN- α), quimiocinas e interleucina-12 (IL-12) (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

Uma das características das citocinas, TNF- α , IL-6, IL-1 α e interferons (INF- α e INF- γ), e do fator inibidor de leucemia (LIF) é a capacidade de inibirem a lipoproteína lipase (LPL), enzima localizada na superfície das células endoteliais dos vasos sanguíneos dos tecidos adiposo e muscular, que degrada os triacilgliceróis do plasma em ácidos graxos e glicerol (BERG *et al.*, 1994). A potência de inibição da LPL é diferente dentre as citocinas, isto é, IL-6 < LIF < TNF- α (TISDALE, 1999). Essas citocinas também são capazes de ativar a enzima lipase hormônio-sensível (HSL), que estimula a hidrólise dos triacilgliceróis nos adipócitos (ARNER, 1995).

Embora a IL-6 tenha aumentado a concentração de triacilgliceróis em ratos, em humanos ela é identificada como um potente modulador do metabolismo de lipídeos, aumentando a oxidação lipídica e a reesterificação de ácidos graxos sem causar hipertriacilgliceridemia (VAN HALL *et al.*, 2003).

Já o TNF- α estimula diretamente a lipólise em humanos pela ativação da proteína quinase ativada por mitógeno (MEK) e da quinase relacionada com sinal extracelular (ERK), confluindo com a diminuição da expressão da fosfodiesterase 3B, a enzima degradante de adenosina monofosfato cíclica (AMPc), resultando em aumento do AMPc intracelular, o qual ativa a proteína quinase A (TISDALE, 2003; WARNE, 2003), estimuladora da HSL.

Além de estimular a lipólise (MacDOUGALD; MANDRUP, 2002; TISDALE, 1999, 2002, 2003; WARNE, 2003), o TNF- α é capaz de promover aumento da apoptose de adipócitos e pré-adipócitos (PRINS *et al.*, 1997; WARNE, 2003) e diminuição dos processos de adipogênese e lipogênese (MacDOUGALD; MANDRUP, 2002; WARNE, 2003). Essa citocina é capaz de causar severa hipertriacilgliceridemia por: a) inibição da LPL e ativação da HSL, como já visto, e inibição de outras enzimas envolvidas na síntese de gorduras, como a acetil-CoA carboxilase (PAPE; KIM, 1988), ácido graxo sintase (PEKALA *et al.*, 1983), glicerol fosfato desidrogenase e proteínas carreadoras de ácidos graxos (TORTI *et al.*, 1985) e b) no fígado, estimulação da lipogênese (BULLÓ-BONET *et al.*, 1999; TISDALE, 1999) e da formação da lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) (BULLÓ-BONET *et al.*, 1999).

A mobilização de ácidos graxos do tecido adiposo pode ocorrer antes da perda de peso corpóreo, sugerindo a presença do LMF, que é produzido e liberado pelo tumor ou pelas metástases, agindo de maneira similar à dos hormônios

lipolíticos (TISDALE, 2000). O LMF é um dos responsáveis pela perda de massa adiposa no processo de caquexia no câncer, por manter a taxa de degradação de triacilgliceróis maior do que a de síntese (TISDALE, 2003, 2004).

Os ácidos graxos poliinsaturados (EPAs) têm se mostrado benéficos no tratamento de indivíduos com câncer, por prevenir a ação do LMF em aumentar a concentração de AMPc em adipócitos. Em estudos *in vitro* em ratos com tumor MAC16, os EPAs inibiram a atividade biológica do LMF e, em estudos *in vivo*, os EPAs também foram efetivos contra os efeitos da caquexia e promoveram inibição do crescimento do tumor (TISDALE; BECK, 1991).

Como resultado do intenso processo de lipólise na caquexia, há aumento dos ácidos graxos circulantes. No tecido adiposo, os ácidos graxos inibem a atividade da LPL, que é, por outro lado, estimulada pela insulina, reduzindo o *clearance* (desaparecimento) dos triacilgliceróis da circulação.

A longa exposição a altas concentrações de ácidos graxos prejudica a secreção de insulina pelas células- β pancreáticas (MLINAR *et al.*, 2007). No músculo, altas concentrações de ácidos graxos inibem a síntese de glicogênio muscular (MLINAR *et al.*, 2007) e favorecem a beta-oxidação, a qual diminui a captação e a oxidação da glicose (DELARUE; MAGNAN, 2007; MLINAR *et al.*, 2007), efeitos que são opostos aos da insulina. No fígado, a alta concentração de ácidos graxos representa substrato abundante para síntese de triacilgliceróis e VLDL, e para estimulação da neoglicogênese (MLINAR *et al.*, 2007). E ainda resulta em acúmulo de diacilglicerol, ativação de duas quinases serina/treonina, PKC- δ e IKK- β (proteína quinase C- δ e quinase inibitória de κ B- β), ativação da via clássica pró-inflamatória IKK- β /I κ B/NF- κ B (quinase inibitória de κ B- β /inibidor de κ B/fator nuclear κ B), e aumento na expressão hepática e níveis plasmáticos de citocinas inflamatórias (BODEN *et al.*, 2005). Em conjunto, os efeitos dos ácidos graxos nos diferentes tecidos implicam em resistência insulínica hepática e periférica (MLINAR *et al.*, 2007; BODEN *et al.*, 2005).

1.3 ALTERAÇÕES NO METABOLISMO DE PROTEÍNAS NA CAQUEXIA ASSOCIADA AO CÂNCER

O conteúdo de proteína no músculo esquelético depende do balanço energético entre sua síntese e degradação (COSTELI; BACCINO, 2003; TISDALE, 2002). Estudos realizados em modelos experimentais de câncer, bem como em humanos portadores de tumor, têm mostrado que a atrofia muscular pode resultar da elevada degradação, reduzida síntese ou ambas (TISDALE, 1999, 2000). A depleção de proteínas pode ser um dos principais fatores associados ao decréscimo de sobrevida dos pacientes caquéticos (LOBERG *et al.*, 2007; TISDALE, 2002).

Há três mecanismos proteolíticos importantes responsáveis pelo catabolismo das proteínas no músculo esquelético (TISDALE, 2001): a) uma via lisossomal, mediada por proteases (catepsinas), envolvida principalmente com a proteólise de proteínas extracelulares e receptores de superfície da célula (LECKER *et al.*, 1999); b) um processo citosólico, dependente de Ca^{2+} , que envolve proteases (calpaínas) ativadas por este íon, e é ativado principalmente quando há lesão no tecido, necrose e autólise (GOLL *et al.*, 1992); e c) um mecanismo dependente de ATP, ubiquitina-proteassoma, que parece ser o principal responsável pela proteólise acelerada em uma variedade de patologias como a sepse, acidose metabólica, diabetes aguda e caquexia induzida por câncer (LECKER *et al.*, 1999).

As três vias proteolíticas podem estar envolvidas na caquexia, porém o sistema ubiquitina-proteassoma é considerado o mais importante (TISDALE, 2001, 2002, 2003). Como esse processo requer ATP, ele pode contribuir no gasto energético observado na caquexia do câncer (TISDALE, 2001). Sob condições normais, a atividade desta via é estimulada por glicocorticóides e hormônio tiroideano e é inibida pela insulina (KOTLER, 2000). Na caquexia, a ativação desta via pode ser desempenhada por mediadores humorais, tais como o PIF e algumas citocinas (KOTLER, 2000; LOBERG *et al.*, 2007).

O PIF, uma glicoproteína sulfatada produzida diretamente pelo tumor (TODOROV *et al.*, 1997), induz a proteólise no músculo esquelético por ativar a via ubiquitina-proteassoma dependente de ATP e reduz a síntese proteica muscular, como demonstrado no músculo gastrocnêmio (TISDALE, 2000, 2001). A administração de PIF em camundongos não-portadores de tumor produziu um

estado de caquexia, com rápida perda de peso, devido à depleção seletiva de massa magra (TISDALE, 1999, 2000).

A degradação de proteínas *in vitro* está associada com significativa elevação de PGE₂, a qual pode atuar como mensageiro intracelular, porque a atenuação do catabolismo protéico com um anticorpo monoclonal para o PIF também inibiu a resposta da PGE₂ (TISDALE, 2000). O PIF também parece ser capaz de aumentar a expressão do NF- κ B (fator capaz de induzir a expressão de genes envolvidos com a degradação protéica) em cultura de células musculares, elevando a proteólise (ARGILÉS *et al.*, 2005).

Tem sido sugerido que citocinas, em particular o TNF- α (KOTLER, 2000; TISDALE, 2003), a IL-6 (TISDALE, 2003), a IL-1 (KOTLER, 2000; TISDALE, 2003) e o INF- γ (ACHARYYA *et al.*, 2004; TISDALE, 2003), podem estar associadas à proteólise e apoptose no músculo esquelético (ARGILÉS *et al.*, 2005). A administração *in vivo* de TNF- α aumentou a expressão do gene e a concentração de ubiquitina livre e conjugada em músculo esquelético de ratos (ARGILÉS *et al.*, 2003; SAINI *et al.*, 2006).

O TNF- α liga-se aos receptores de superfície (TNFR1) e ativa o fator de transcrição NF- κ B por uma cascata de eventos que resulta em degradação do I- κ B α , proteína que inibe o NF- κ B. Este processo depende da produção mitocondrial, induzida por TNF- α , de ROS que conduz à rápida degradação do I- κ B α e ativação da via ubiquitina. Esses eventos culminam na translocação do NF- κ B ao núcleo e expressão de genes envolvidos na indução da proteólise muscular (SAINI *et al.*, 2006).

Em conjunto com a massiva perda de proteína do músculo esquelético, durante a caquexia do câncer, o DNA muscular é também reduzido por fragmentação, resultando em apoptose. Este fenômeno pode estar associado com o TNF- α , uma vez que esta citocina pode mimetizar a resposta apoptótica em músculos de animais saudáveis (ARGILÉS *et al.*, 2005).

A IL-6 encurta a meia-vida de proteínas de vida longa e aumenta a atividade do proteassoma 26S e das catepsinas B e B+L (TISDALE, 1999). Um estudo mostrou que o tratamento com um anticorpo para a IL-6 reverteu com sucesso os parâmetros-chave da caquexia em camundongos portadores de adenocarcinoma de cólon, entretanto há um estudo com músculo incubado de rato

que não encontrou efeito direto da IL-6 na proteólise muscular (ARGILÉS *et al.*, 2003, 2005).

Embora sejam capazes de ativar a expressão do gene da ubiquitina, não há estudos demonstrando a degradação protéica diretamente pela IL-1 ou pelo IFN- γ . Porém o tratamento de ratos com IL-1 β demonstrou seu efeito sinérgico com o TNF- α (TISDALE, 2003) e também uma regulação positiva na expressão das ubiquitina ligases MuRF1 e MAFbx/atrogina-1 (COSTELI; BACCINO, 2003). Adicionalmente, a utilização de anticorpo monoclonal contra INF- γ foi capaz de reverter a degradação muscular associada ao crescimento do carcinoma pulmonar de Lewis em camundongos (ARGILÉS *et al.*, 2003, 2005, TISDALE, 2003).

Alguns tumores, como o Walker-256, são capazes de produzir toxormônios que inibem a incorporação de aminoácidos em proteínas miofibrilares. A inibição da síntese protéica em músculo estriado, e também *in vitro* (*cell-free*), pelo toxormônio é de particular significância como causa direta da caquexia (RUBIN, 2003).

A perda de massa muscular é refletida nas concentrações de aminoácidos plasmáticos. A maioria dos estudos reporta um decréscimo de aminoácidos neoglicogênicos em portadores de tumor, em contraste aos indivíduos severamente mal-nutridos, onde as concentrações de aminoácidos de cadeia ramificada no plasma estão normais ou até aumentadas (TISDALE, 2003). Aminoácidos neoglicogênicos são aqueles cujo catabolismo origina piruvato ou um dos intermediários do ciclo de Krebs, importantes para a neoglicogênese e para a síntese de glicogênio no fígado e músculo dos animais (GUAITANI *et al.*, 1982).

A célula tumoral é capaz de usar qualquer substrato como fonte energética: glicose, lipídeos, corpos cetônicos e mesmo aminoácidos. A utilização de glicose e ácidos graxos de cadeia longa diminui a taxa de utilização de glutamina, indicando que as células tumorais dão preferência aos primeiros substratos, se presentes (MEDINA, 2001). Neoplasias altamente malignas se desenvolvem com pouca vascularização, portanto, altas taxas glicolíticas anaeróbica e glutaminolíticas suprem essa falta de irrigação sanguínea, permitindo que o tumor sobreviva em áreas de hipóxia (MAZUREK *et al.*, 1997).

A glutamina e a alanina são dois eficientes transportadores de nitrogênio e de esqueleto carbônico entre os diferentes tecidos do organismo. O íon amônio é extremamente tóxico à maioria das células, a menos que seja carregado por

um aminoácido. A glutamina é o principal veículo para o transporte de amônia em uma forma não-tóxica e a principal fonte de nitrogênio das células tumorais, já que é o aminoácido mais abundante do corpo. Isso acarreta profundas mudanças no metabolismo do hospedeiro, acomodando-o às necessidades crescentes de glutamina pelo tumor (TISDALE, 2005). No tumor, a glutamina é utilizada como fonte de energia, quando convertida a lactato (glutaminólise), ou para a síntese de novos componentes nitrogenados, inclusive purinas e pirimidinas. Assim, o tumor produz respostas específicas no metabolismo do nitrogênio, de modo que todo o organismo do hospedeiro é mobilizado para que a taxa circulante de glutamina aumente (MEDINA, 2001).

1.4 ALTERAÇÕES NO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS NA CAQUEXIA ASSOCIADA AO CÂNCER

O metabolismo de carboidratos é dependente do estado alimentar do indivíduo. Com a menor ingestão alimentar, como durante a anorexia - definida por perda do apetite e pela saciedade precoce, ocorrem inúmeras mudanças metabólicas (CASPER, 1996; TISDALE, 2001).

A anorexia está presente em mais da metade dos pacientes com câncer e, de um modo geral, as citocinas parecem induzir anorexia por inibição do neuropeptídeo Y (NPY), o mais potente estimulador do apetite (neuropeptídeo orexigênico) e/ou por estimulação do fator liberador de corticotrofina (CRF), um neuropeptídeo anorexigênico (INUI; MEGUID, 2003).

O TNF- α parece modular neurônios sensíveis à glicose do núcleo ventromedial e da área hipotalâmica lateral provocando supressão da ingestão alimentar de maneira dose-dependente (RAMOS *et al.*, 2004). A IL-1 induz anorexia principalmente devido ao desenvolvimento de saciedade precoce, a qual tem sido correlacionada com aumento da atividade serotoninérgica (RAMOS *et al.* 2004). Com relação à IL-6, seu mecanismo não está claro, mas estudos mostram melhora de apetite e ganho de peso pela menor expressão desta citocina após aplicação de corticosteróides ou antagonistas específicos, como anticorpo anti-(IL-6) (MARTIGNONI *et al.*, 2003). Também não se sabe o mecanismo pelo qual o IFN- γ

provoca anorexia. A administração de anti-(IFN- γ) em ratos com sarcoma MCG reduziu a anorexia e a perda de peso, e aumentou o tempo de sobrevivência, mas o efeito foi fugaz mesmo com reforço de anticorpo, mostrando que tal citocina não causa o estado de anorexia-caquexia isoladamente (NETO *et al.*, 2001). Adicionalmente, alguns hormônios circulantes, que são conhecidos por terem efeitos importantes na regulação da ingestão alimentar e no peso corpóreo, tais como leptina (anorexigênico) e grelina (orexigênico), parecem exercer alguma função nesta síndrome. Entretanto, os papéis da leptina e da grelina na anorexia do câncer são pobremente definidos, e ainda podem variar dependendo dos diferentes estados da doença, agudo ou crônico (RAMOS *et al.*, 2004).

Embora a anorexia provoque mudanças no metabolismo de carboidratos e seja freqüentemente associada à caquexia do câncer, outros fatores contribuem para tais alterações, como, por exemplo, a atividade metabólica do próprio tumor (TISDALE, 2001).

A arquitetura dos tumores sólidos possui importância na determinação dos substratos metabólicos utilizados para a produção de energia. Grandes tumores sólidos, como o Walker-256, de crescimento rápido e pouca vascularização, apresentam pobre suprimento sanguíneo. Muitas regiões tumorais tornam-se hipóxicas e utilizam, preferencialmente, a via glicolítica anaeróbica para a produção de energia (VICENTINO *et al.*, 2002b).

Assim, nestes tipos de tumor, a glicose é a fonte primária de energia (TISDALE, 2000), e a quantidade requerida pelas células tumorais é cerca de quatro a cinco vezes à das células normais (TIJERINA, 2004), estabelecendo-se um mecanismo de competição por este substrato entre o tumor e os demais tecidos do hospedeiro.

O aumento na captação de glicose e de sua conversão para lactato é necessário para manter o nível de ATP para sobrevivência e proliferação contínua das células tumorais, e estes mecanismos são mediados pelo fator induzido por hipóxia (HIF), um fator de transcrição capaz de estimular a expressão de mais de 70 genes (BRAHIMI-HORN *et al.*, 2007).

Sob estas condições de hipóxia, a rápida taxa de utilização de glicose pelas células tumorais juntamente com a anorexia resultam em hipoglicemia no hospedeiro e elevação da concentração de lactato sanguíneo, o qual é convertido novamente à glicose no fígado pela via da neoglicogênese, estabelecendo entre o

tumor e o fígado um ciclo fútil, conhecido como ciclo de Cori (BONGAERTS *et al.*, 2006; PIFFAR *et al.*, 2003).

O *turnover* da glicose pelo ciclo de Cori aumenta de 20%, em indivíduos normais, para 50%, em indivíduos com caquexia neoplásica, sendo responsável pela eliminação de 60% do lactato produzido pelo tumor (TISDALE, 2000). A atividade aumentada do ciclo de Cori contribui para o aumento do gasto energético na caquexia, visto que a neoglicogênese a partir do lactato utiliza seis moléculas de ATP para cada conversão de lactato a glicose, e a oxidação anaeróbica de glicose pelas células tumorais produz 4 ATPs, sendo então parte da energia dissipada em forma de calor (BONGAERTS *et al.*, 2006; MORLEY *et al.*, 2006; TISDALE, 2002).

A liberação hepática de glicose está aumentada em até 40% em indivíduos com câncer (TAYEK, 1992), o que pode ser explicado pela elevada neoglicogênese e pela ação do LMF, o qual possui potencial de ativar a glicogenólise em hepatócitos através de aumento no AMPc. O fluxo hepático aumentado de glicose para o sangue é necessário para suprir o requerimento de energia do tumor e do hospedeiro portador do tumor (HIRAI *et al.*, 1997).

Embora haja trabalhos demonstrando que em portadores de tumor há maior liberação de glicose pela neoglicogênese hepática, há estudos de perfusão de fígado que evidenciaram diminuição da neoglicogênese, especialmente quando a alanina foi o precursor neoglicogênico utilizado (KELMER-BRACHT *et al.*, 2006).

A menor taxa neoglicogênica hepática pode contribuir para a baixa concentração de glicose plasmática encontrada nos pacientes caquéticos com câncer. Os mesmos apresentam hipoinsulinemia, bem como elevadas concentrações de glucagon, hormônio do crescimento e cortisol plasmáticos (BONGAERTS *et al.*, 2006). As concentrações de insulina plasmática têm se mostrado diminuídas em casos de hipoglicemia associada a alguns tipos de tumores, como o Walker-256 (PIFFAR *et al.*, 2003), e a taxa de secreção de insulina, pelas ilhotas de Langerhans, em resposta ao estímulo glicose, se mostra baixa em ratos portadores de tumor Walker-256 (FERNANDES *et al.*, 1990).

Resistência insulínica tem sido observada em animais portadores de caquexia/câncer. A menor atividade da LPL das células endoteliais, em ratos portadores de sarcoma MCA, pode ser decorrente da resistência à insulina (NOGUCHI *et al.*, 1996). Em células adiposas de ratos com sarcoma MCA há

decréscimo na quantidade total de GLUT4 no estado basal e na translocação de GLUT4 em resposta ao estímulo insulínico (YOSHIKAWA *et al.*, 1997). A resistência insulínica nestas células pode ser causada pela inibição da fosforilação da tirosina do substrato do receptor de insulina-1 (IRS-1) (YOSHIKAWA *et al.*, 1999).

Em humanos portadores de carcinoma e caquéticos, a intolerância à glicose e a resposta anormal à insulina parecem ser a mesma de animais, indicando decréscimo da função hepática e resistência à insulina (ROFE *et al.*, 1994; TAYEK, 1992).

Algumas citocinas podem atuar diretamente no metabolismo de carboidratos de indivíduos caquéticos, como o TNF- α , que é capaz de promover resistência à insulina em hepatócitos (HOTAMISLIGIL, 1999; TORISU *et al.*, 2007), células adiposas (HOTAMISLIGIL, 1999; MLINAR *et al.*, 2007; PATIAG *et al.*, 2000; YOSHIKAWA *et al.*, 1999; WARNE, 2003) e músculo esquelético (PLOMGAARD *et al.*, 2005).

A infusão *in vivo* de TNF- α em humanos saudáveis reduziu a ação estimulatória da insulina no IRS-1, por aumentar a fosforilação do resíduo de serina e diminuir a fosforilação da tirosina em músculo esquelético, além de reduzir a fosforilação da proteína quinase B (PKB ou AKT), o que pode prover um mecanismo de resistência insulínica na captação de glicose, porque a translocação do GLUT4 é dependente, dentre outros, da fosforilação da PKB (PLOMGAARD *et al.*, 2005). A PKB é uma quinase específica para serinas/treoninas que se encontra provavelmente inativa nas células na ausência de estímulo insulínico, tornando-se ativa após sua fosforilação e assim regulando a sinalização da insulina, o metabolismo da glicose bem como o crescimento, o ciclo e a proliferação celular (DOWNWARD, 1998).

Outros achados indicam que o receptor de insulina seja modificado ou o próprio TNF- α promova a produção de um inibidor para o receptor de insulina, atenuando a captação de glicose (HOTAMISLIGIL, 1999). Além dos receptores transmembranas, há duas proteínas receptoras solúveis para o TNF- α (BULLÓ-BONET *et al.*, 1999), as quais estão em maior concentração em pacientes com câncer (ELSASSER-BEILE *et al.*, 1994). Embora não esteja completamente elucidado, é possível que o TNF- α exerça as respostas citotóxicas e as alterações metabólicas quando ligado a um desses receptores (PATIAG *et al.*, 2000). O TNF- α pode exercer os seus efeitos de forma autócrina ou parácrina, quando em baixa

concentração, ou de maneira endócrina, quando liberado no sangue em maior concentração (BULLÓ-BONET *et al.*, 1999).

A interleucina-6 (IL-6) é outra citocina implicada na resistência à insulina durante a caquexia (TISDALE, 1997) e está correlacionada ao aumento da concentração circulante de TNF- α , visto que o TNF- α induz a produção da IL-6, que, por sua vez, inibe a expressão do gene do TNF- α (LANGSTEIN; NORTON, 1991; NETO *et al.*, 2001).

A IL-6 induz, *in vivo* e *in vitro*, a expressão da proteína supressora da sinalização de citocinas-3 (SOCS-3) hepática, capaz de inibir a sinalização do receptor de insulina, promovendo resistência à insulina (SENN *et al.*, 2003) e ainda funciona como uma E3 ubiquitina-ligase (principal enzima da cascata de ubiquitinação da via proteolítica ubiquitina-proteassoma, conhecida também como atrogina-1) para IRS-1 (TORISU *et al.*, 2007). A SOCS-3 associa-se com o receptor de insulina, suprimindo a sua autofosforilação, a fosforilação da tirosina do IRS-1, a associação do IRS-1 com a subunidade p85 da proteína quinase-3 (PI3K) e a ativação da PKB (SENN *et al.*, 2003; TORISU *et al.*, 2007).

Em resumo, os dados da literatura demonstram que na caquexia por câncer há alterações complexas e profundas no metabolismo de lipídeos, proteínas e carboidratos. Entretanto, não há estudos caracterizando parâmetros plasmáticos e hepáticos das alterações metabólicas ao longo do período de desenvolvimento da caquexia/câncer, particularmente em ratos portadores do tumor Walker-256. A neoglicogênese hepática é outra questão obscura na caquexia associada ao câncer, especialmente no modelo Walker-256. Diante disto, seguem-se os objetivos do presente trabalho.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar possíveis alterações metabólicas em parâmetros plasmáticos e hepáticos na caquexia induzida por tumor Walker-256.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar a caquexia ao longo do desenvolvimento do tumor Walker-256 em ratos e avaliar a ingestão alimentar e a massa do músculo gastrocnêmio no dias 5, 8, 11 e 14 após a inoculação das células tumorais.
- Avaliar o perfil lipídico (colesterol, triacilgliceróis e ácidos graxos livres) e a concentração de precursores neoglicogênicos (glicerol e lactato) plasmáticos, bem como a uremia, glicemia e o conteúdo de glicogênio hepático em ratos portadores de tumor Walker-256 no 5^o, 8^o, 11^o e 14^o dias após a inoculação das células tumorais.
- Avaliar em estudos de perfusão de fígado, no 12^o dia após a inoculação das células tumorais, a neoglicogênese e o consumo de oxigênio a partir de vários precursores de glicose (L-alanina, piruvato, L-lactato e glicerol).

Material e Métodos

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 REAGENTES

Os sais do líquido de perfusão, os precursores neoglicogênicos e os demais reagentes foram adquiridos da SIGMA, MERCK, REAGEN, J.T. Backer, Mallinckrodt, Nuclear ou CAQ – Casa Química.

3.2 ANIMAIS

Foram utilizados ratos machos adultos, da linhagem Wistar, pesando entre 220 e 230 g, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina e mantidos em gaiolas coletivas no Biotério do Departamento de Ciências Fisiológicas, a uma temperatura de $23\pm 2^{\circ}\text{C}$, com ciclo claro/escuro de 12 horas, livre acesso à água e alimentados com ração Nuvilab® para roedores. Os experimentos, cujos protocolos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Londrina, foram sempre iniciados no mesmo horário para minimizar variações circadianas.

Nos experimentos para caracterização da caquexia ou para avaliação das alterações metabólicas plasmáticas e do conteúdo de glicogênio hepático foram utilizados de 5 a 20 animais por grupo, nos seguintes grupos:

- *Grupo Walker-256 (WK)*: ratos portadores de tumor Walker-256 alimentados à vontade, os quais foram subdivididos em 4 subgrupos – 5°, 8°, 11° e 14° dias após a inoculação das células tumorais;
- *Grupo Controle Pair Fed*: ratos sem tumor que receberam diariamente a mesma quantidade de ração (alimentação reduzida) que ingerem os animais do grupo tumor, os quais foram subdivididos em 4 subgrupos – 5°, 8°, 11° e 14° dias após a inoculação de PBS (salina tamponada com fosfato);

- *Grupo Controle*: ratos sem tumor (inoculação de PBS), alimentados à vontade.

Nos experimentos para avaliação da neoglicogênese e do consumo de oxigênio hepáticos foram utilizados de 4 a 12 animais por grupo, nos seguintes grupos:

- *Grupo Controle*: ratos sem tumor (inoculação de PBS), com 24 horas de privação alimentar;
- *Grupo Walker-256 (WK)*: ratos portadores de tumor Walker-256, no 12º dia após a inoculação das células tumorais, com 24 horas de privação alimentar.

3.3 IMPLANTAÇÃO DO TUMOR WALKER-256

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

Os ratos do grupo tumor foram inoculados com $8,0 \times 10^7$ células tumorais viáveis/animal, subcutaneamente, no flanco direito traseiro. Para os grupos *pair fed* e demais controles foi inoculado PBS no mesmo local. Para estes procedimentos os animais foram previamente anestesiados com éter etílico.

3.4 EXPERIMENTOS PARA CARACTERIZAÇÃO DA CAQUEXIA EM RATOS PORTADORES DE TUMOR WALKER-256 E AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS RELACIONADOS

No dia antecedente ao 5^o, 8^o, 11^o ou 14^o dias após a inoculação das células tumorais (grupo WK) ou PBS (grupo controle), os animais foram alojados em gaiolas metabólicas individuais, contendo 40 g de ração e água à vontade, para a análise de ingestão alimentar. Após 24 horas, a sobra da ração foi pesada e subtraída da quantidade ofertada inicialmente, para o cálculo da quantidade diária ingerida por 100 gramas de peso corporal (g%). Baseado nas médias de ingestão alimentar foi realizado o grupo controle *pair fed*.

Em seguida, os animais foram pesados, anestesiados com éter etílico e eutanasiados por deslocamento cervical. Logo após, a massa tumoral total (tumor do flanco e metástases) foi cuidadosamente dissecada e pesada para o cálculo da % de perda de massa corpórea de acordo com a equação abaixo. Os animais foram considerados caquéticos quando apresentaram perda de massa corpórea próxima ou maior que 10%.

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

Onde:

mie = massa corpórea inicial do animal com tumor;

mfe = massa corpórea final do animal com tumor;

mt = massa do tumor;

gmc = ganho de massa do grupo controle.

Assim como a massa tumoral, o músculo gastrocnêmio também foi cuidadosamente dissecado e pesado. A massa obtida em g foi submetida ao cálculo abaixo para expressão em g%:

$$mmgc = \frac{mma}{mfe - mt} \times 100$$

Onde:

mmgc = massa do músculo gastrocnêmio em g%;

mmg = massa do músculo gastrocnêmio em g da pata contralateral à inoculada;

mfe = massa corpórea final do animal com tumor;

mt = massa do tumor.

3.5 EXPERIMENTOS PARA AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES METABÓLICAS PLASMÁTICAS E DO CONTEÚDO DE GLICOGÊNIO HEPÁTICO

Nos dias 5, 8, 11 e 14 após a inoculação das células tumorais (grupo WK) ou PBS (grupos controle *pair fed* e controle), os animais foram pesados e submetidos à decapitação para coleta de sangue. O fígado foi imediatamente retirado e congelado para posterior quantificação do conteúdo de glicogênio. As amostras de sangue foram rapidamente centrifugadas e os plasmas armazenados em freezer para posterior determinação das concentrações de colesterol total, triacilgliceróis, ácidos graxos livres, glicerol, lactato, uréia e glicose.

3.6 EXPERIMENTOS DE PERFUSÃO DE FÍGADO *IN SITU* PARA AVALIAÇÃO DA NEOGLICOGÊNESE E DO CONSUMO DE OXIGÊNIO HEPÁTICOS

No 12^o dia após a inoculação das células tumorais (grupo WK) ou PBS (grupo controle), os animais foram pesados e submetidos à técnica de perfusão de fígado *in situ*, introduzida no Brasil por Kelmer-Bracht *et al* (1984).

O sistema para a perfusão de fígado é basicamente composto por: reservatórios para o líquido de perfusão, uma bomba peristáltica e um oxigenador de membrana, acoplados a um banho-maria com bomba de circulação externa de água aquecida e um cilindro com mistura carbogênica (O₂/CO₂=95/5%).

O oxigenador de membrana é formado por um cilindro duplo de alumínio, ao redor do qual estão enrolados tubos de silicone de parede fina (0,25 mm), com diâmetro interno de 2 mm e comprimento total de 15 metros. A câmara interna do cilindro de alumínio é termostatizada pelo banho-maria, por meio da bomba de circulação externa de água aquecida. O cilindro de alumínio está isolado do ambiente por uma cobertura cilíndrica de plástico transparente, mantendo-se no seu interior uma atmosfera de O₂ e CO₂, nas proporções de 95:5. O sistema ainda contém um dispositivo que impede a entrada de bolhas de ar no fígado (capta-bolhas).

O líquido de perfusão utilizado foi o tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato (KH) (KREBS; HENSELEIT *apud* KELMER-BRACHT, 1993) modificado por Souza (1999). No sistema de perfusão o líquido de perfusão é impulsionado pela bomba peristáltica em direção ao oxigenador de membrana. Neste local se processam as trocas gasosas. O O₂ e o CO₂ contidos na atmosfera carbogênica (95% O₂ / 5% CO₂), por troca passiva, passam para o líquido de perfusão que circula no interior dos tubos de silicone. A fina espessura da parede destes tubos, seu pequeno diâmetro e o seu comprimento total (grande área de secção transversa) favorecem as trocas. Com os fluxos normalmente utilizados (nunca acima de 45 mL por minuto), o tempo de permanência do líquido no oxigenador de membrana é de aproximadamente 1 minuto, e a saturação, próxima a 99%. Desse modo, o líquido saturado de ar (21% de O₂, 78% de N₂ além de outros), por troca passiva, satura-se com 95% de O₂ e 5% de CO₂. A entrada de CO₂ no líquido de perfusão diminui o seu pH inicial de 7,6 para 7,4. O líquido de perfusão deixa o oxigenador, saturado de O₂ e CO₂, aquecido a 37°C e com pH 7,4, passa pelo capta-bolhas e se desloca em direção à cânula a ser inserida na veia porta.

Para a perfusão do fígado, os animais controles e portadores do tumor Walker-256 foram anestesiados com pentobarbital sódico (40 mg/Kg) e fixados em mesa cirúrgica. O abdômen foi aberto até a altura do diafragma por uma incisão longitudinal central e duas incisões laterais, com exposição do fígado e dos demais órgãos. Ligaduras frouxas foram colocadas ao redor da veia cava inferior, logo acima da veia renal direita, e ao redor da veia porta. Em seguida a veia porta foi canulada sob baixo fluxo, aproximadamente 10 mL/minuto e, imediatamente após a canulação, os vasos abdominais abaixo do fígado foram seccionados para que houvesse completo dessangramento deste órgão. Esta incisão dá vazão ao líquido

extra que é bombeado para o sistema circulatório, evitando o aumento excessivo de pressão no fígado. Logo após, o fluxo foi elevado para garantir a oxigenação hepática, e a ligadura em torno da veia porta foi amarrada para fixação da cânula. O tórax foi aberto para exposição completa do fígado, e a veia cava inferior, acima do diafragma, foi ocluída para desviar o líquido, que deixa o fígado através da veia hepática, para a veia cava inferior, abaixo do fígado. Posteriormente, a veia cava inferior (porção infra-hepática) foi canulada e a extremidade livre da cânula foi conectada a uma câmara de acrílico onde estava posicionado o eletrodo de Clark para registro da concentração de oxigênio no líquido efluente (perfusado).

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

A perfusão do fígado foi, portanto, realizada em sistema aberto (não-recirculante), sendo o direcionamento do fluxo no sentido do hepatócito periportal para o hepatócito perivenoso (perfusão monovascular anterógrada).

Após os 20 minutos iniciais de perfusão, para a estabilização do consumo de oxigênio, o líquido efluente do fígado, depois de passar pelo eletrodo de oxigênio, foi coletado em intervalos de 2 minutos para determinação da concentração de glicose, lactato, piruvato ou uréia. Durante este período a perfusão do fígado dos animais controles e portadores de tumor Walker-256 foi realizada por um dos seguintes modos:

0-10 min	10-40 min	40-60 min
KH*	KH + piruvato 5 mM, L-lactato 2 mM, L-lactato 8 mM ou glicerol 2 mM	KH
KH	KH + L-alanina 2,5 mM	

*KH= Krebs-Henseleit

Ao término do experimento, o fígado foi retirado e pesado para que a produção de glicose, lactato, piruvato ou uréia por grama de fígado ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$) pudesse ser quantificada. A expressão dos resultados em relação ao peso do órgão

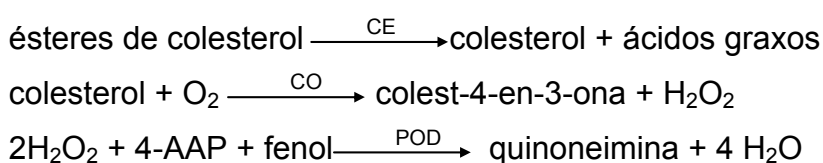
permite comparações de experimentos nos quais foram empregados fígados com diferentes pesos.

Finalmente, o tumor foi cuidadosamente dissecado e pesado para confirmação do estado caquético, pela equação descrita anteriormente.

3.7 PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS

3.7.1 Determinação da concentração de colesterol total

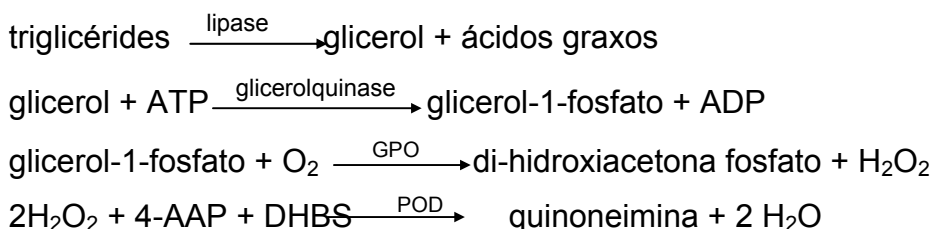
A concentração de colesterol total no plasma foi determinada por método enzimático, conforme descrito por Tietz (1995), onde os ésteres de colesterol são clivados a colesterol e ácidos graxos pela colesterol-esterase (CE). O colesterol resultante é oxidado enzimaticamente pela colesterol-oxidase (CO) a peróxido de hidrogênio e colest-4-en-3-ona. O peróxido de hidrogênio, em presença da peroxidase (POD), produz a ligação oxidativa do fenol com a 4-aminoantipirina (4-AAP) e dá origem a um cromógeno com máximo de absorção no comprimento de onda de 505 nm.



3.7.2 Determinação da concentração de triacilgliceróis

A concentração de triacilgliceróis no plasma foi determinada por método enzimático baseado na reação de Trinder (1969). Neste método, os triacilgliceróis são convertidos pela lipase a glicerol e ácidos graxos, o glicerol a glicerol-1-fosfato pela glicerolquinase e o glicerol-1-fostato resultante é oxidado enzimaticamente pela glicerol-1-fosfato oxidase (GPO) a peróxido de hidrogênio e di-hidroxiacetona

fosfato. O peróxido de hidrogênio, em presença da peroxidase (POD), produz a ligação oxidativa do 3,5-dicloro-2-hidroxibenzenosulfonato (DHBS) com a 4-aminoantipirina (4-AAP) e dá origem a um cromógeno com o máximo de absorção no comprimento de onda de 505 nm.



3.7.3 Determinação da concentração de ácidos graxos livres

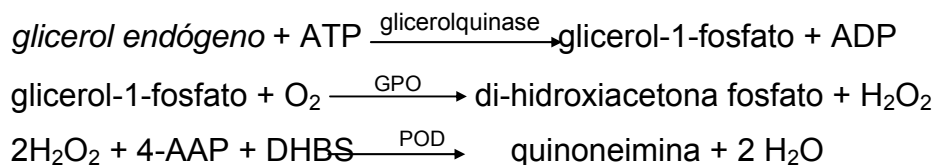
Os ácidos graxos livres foram determinados pelo método de Falholt *et al.* (1973). Neste método os ácidos graxos livres são extraídos do plasma por meio de solução extratora (clorofórmio-heptano-metanol e tampão fosfato). Os ácidos graxos reagem com o reativo de cor (difenilcarbazida + difenilcarbazona em etanol) dando origem a um cromógeno que se quantifica espectrofotometricamente a 550 nm.



3.7.4 Determinação da concentração de glicerol

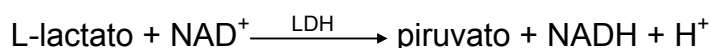
O glicerol plasmático foi quantificado por “kit” enzimático específico para dosagem de triacilgliceróis, utilizando-se o mesmo procedimento de determinação dos triacilgliceróis, descrito anteriormente, exceto que a lipase, a enzima que cliva os triacilgliceróis da amostra em glicerol e ácidos graxos não foi adicionada ao ensaio. As reações a seguir resumem o procedimento:





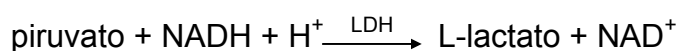
3.7.5 Determinação da concentração de lactato

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



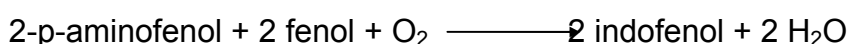
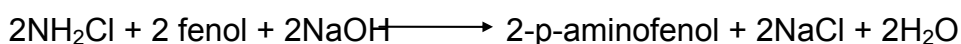
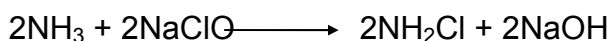
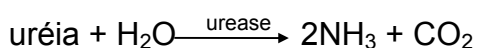
3.7.6 Determinação da concentração de piruvato

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



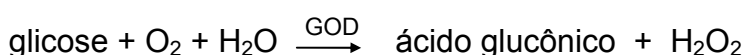
3.7.7 Determinação da concentração de uréia

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



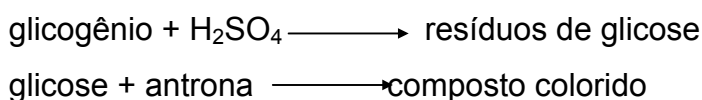
3.7.8 Determinação da concentração de glicose

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



3.7.9 Determinação da concentração de glicogênio hepático

O glicogênio hepático foi quantificado pelo método da antrona, segundo a técnica de Hassid e Abraham (1957). Nesse método resíduos de glicose liberados pela hidrólise ácida do glicogênio (ácido sulfúrico) reagem com a antrona e dão origem a um composto colorido que se quantifica espectrofotometricamente a 620 nm.



3.7.10 Determinação do consumo de oxigênio hepático

O consumo de oxigênio pelo fígado foi calculado a partir da seguinte equação:

$$\text{Consumo de O}_2 = [\text{O}_2 \text{ porta}] - [\text{O}_2 \text{ cava}] \times \frac{\text{Fluxo}}{\text{Peso fígado}} \quad (\mu\text{mol}/\text{min.g})$$

Onde:

[O₂ porta] = concentração de oxigênio que entra no fígado, ou seja, aquela presente no líquido de perfusão (860 μM), quando saturado com 95% de oxigênio da mistura carbogênica.

[O₂ cava] = concentração de oxigênio que deixa o fígado, ou seja, aquela presente no líquido de perfusão efluente, após passar pelo fígado. A concentração de oxigênio no perfusado efluente foi medida polarograficamente através de um eletrodo de oxigênio (eletrodo de Clark ou oxímetro), durante todo o período de perfusão.

3.8 PROCEDIMENTOS ESTATÍSTICOS

Os experimentos foram realizados de forma inteiramente casualizada e todos os dados obtidos foram testados quanto à distribuição normal (testes de Shapiro-Wilk e Lilliefors) e à homogeneidade das variâncias (testes de Levene e Brown Forsythe). Na constatação de que foram satisfeitas as condições para aplicação dos testes estatísticos paramétricos de comparação de médias, as seguintes análises estatísticas foram realizadas:

a) os dados das análises plasmáticas de colesterol total, triacilgliceróis, ácidos graxos livres, glicerol e glicemia e também o conteúdo de glicogênio hepático, por terem apresentado as devidas características de independência, foram comparados por Análise de Variância Unidimensional (ANOVA), seguida por teste de Newman-Keuls;

b) as diferenças entre as áreas sob as curvas (AUCs) na perfusão de fígado foram avaliadas pelo teste t de Student para amostras independentes. As AUCs foram calculadas, no intervalo de tempo onde o fígado foi submetido à perfusão com o precursor neoglicogênico (L-alanina, piruvato, L-lactato ou glicerol).

Nos conjuntos de dados em que não foram observadas distribuição normal e, principalmente, homogeneidade das variâncias, testes estatísticos não-paramétricos foram adotados. Para avaliação dos resultados de massa do músculo gastrocnêmio, ingestão alimentar e concentrações de uréia e lactato plasmáticos, os quais conferem mais de dois tratamentos e caracterizados como independentes, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis seguido por teste de Dunn.

Os resultados foram expressos como média dos resultados \pm erro padrão da média. Todos as análises foram realizadas utilizando-se os programas STATISTICA 6.0 e GRAPHPAD PRISM 4.0, adotando-se nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Resultados

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DA CAQUEXIA EM RATOS PORTADORES DE TUMOR WALKER-256 E ANÁLISE DE PARÂMETROS RELACIONADOS

A tabela 1 ilustra os valores das massas tumorais nos 5º, 8º, 11º e 14º dias após a inoculação das células Walker-256. Como pode ser observado, houve aumento progressivo na massa tumoral do flanco e das metástases, que alcançaram valores próximos a 24 g e 12 g respectivamente no 14º dia de tumor. Metástases foram encontradas principalmente em linfonodos lombares, na cavidade abdominal e nódulos torácicos. A massa tumoral total, que corresponde à soma das massas do flanco e das metástases, foi de aproximadamente 36 g no 14º dia de tumor, representando uma fração considerável (cerca de 16%) do peso do animal.

Os animais portadores do tumor Walker-256 apresentaram perda progressiva de massa corpórea ao longo do desenvolvimento do tumor, que pode ser correlacionada com o crescimento da massa tumoral total (tabela 1). No 5º dia após a inoculação das células tumorais, a perda de massa corpórea foi de aproximadamente 10%, o que caracteriza a presença da caquexia já no início do desenvolvimento tumoral. No 14º dia, a perda de massa corpórea foi de $25,66 \pm 1,25\%$, um valor bastante acentuado.

A tabela 1 também demonstra que houve redução na massa do músculo gastrocnêmio e na ingestão alimentar nos animais portadores de tumor no 11º e 14º dias, em comparação com animais controles. A redução da ingestão alimentar foi de 32% no 11º dia e de 31% no 14º dia, caracterizando a presença da anorexia nestes animais.

Tabela 1 – Caracterização da caquexia em ratos portadores de tumor Walker-256 e análise de parâmetros relacionados. Massas tumorais do flanco, das metástases e total, percentagem de perda de massa corpórea, massa do músculo gastrocnêmio e ingestão alimentar diária em ratos controle alimentados e portadores de tumor Walker-256 (WK) nos dias 5, 8, 11 e 14 após inoculação das células tumorais.

	Controle	WK-5	WK-8	WK-11	WK-14
Massa tumoral flanco (g)		6,66±0,49	10,20±1,03	16,04±1,48	24,13±1,60
Massa tumoral metástases (g)		0,05±0,03	1,75±0,34	3,08±1,26	12,47±1,57
Massa tumoral total (g)		6,71±0,49	11,95±1,27	19,12±2,43	36,12±2,27
Perda de massa corpórea (%)		8,93±1,98	9,32±1,20	13,93±1,67	25,66±1,25
Massa do gastrocnêmio (g%)	0,59±0,01	0,57±0,01	0,57±0,01	0,53±0,02*	0,52±0,02**
Ingestão alimentar/24 h (g%)	8,30±0,24	7,73±0,61	8,80±0,24	5,59±0,40**	5,73±0,57**

Valores representam a média ± erro padrão da média, n= 13 a 20. *p<0,05 e **p<0,01 *versus* controle (ANOVA One-Way, seguido por Newman-Keuls).

4.2 AVALIAÇÃO DOS LIPÍDEOS PLASMÁTICOS

Como pode ser observado na figura 1, não houve mudanças nas concentrações plasmáticas de colesterol total dos grupos WK e controle *pair fed* para todos os dias analisados quando comparadas ao grupo alimentado, porém observou-se diminuição a partir do 11º dia após a inoculação das células tumorais em relação ao grupo controle *pair fed* correspondente.

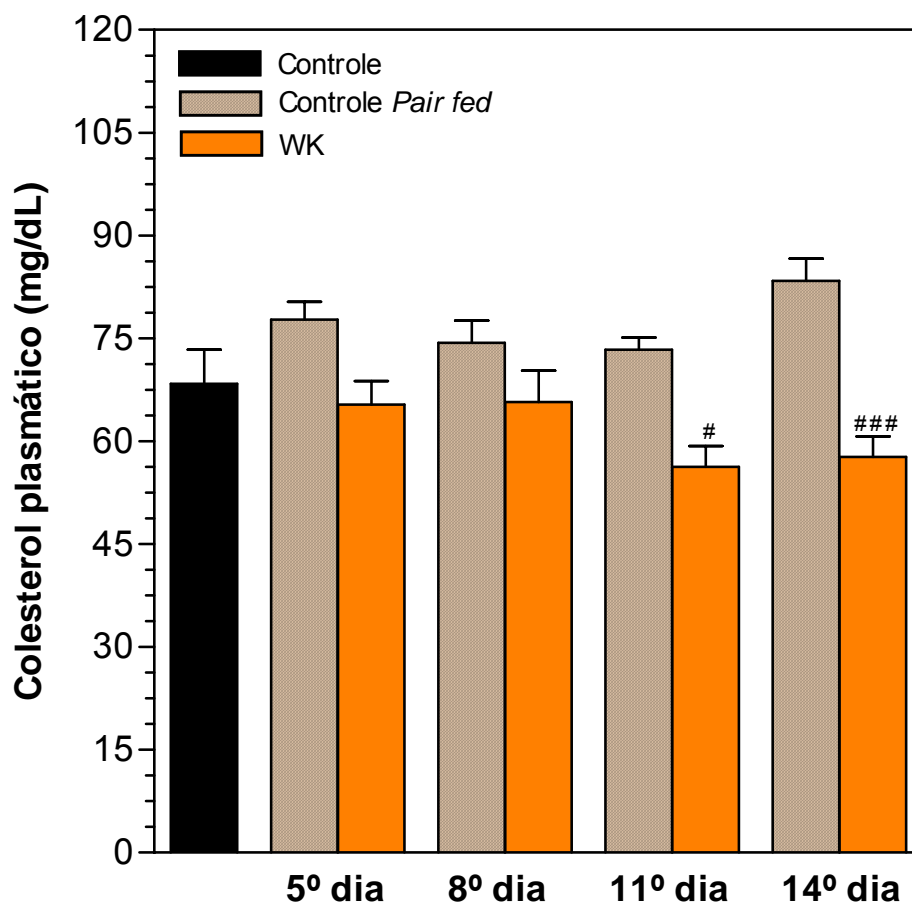


Figura 1 – Concentrações de colesterol plasmático de ratos controle, controle *pair fed* e portadores de tumor Walker-256 no 5º, 8º, 11º e 14º dias após a inoculação das células tumorais. Cada barra representa a média \pm erro padrão da média de 10 a 16 experimentos. Resultados analisados por ANOVA One-Way seguida de Newman-Keuls. [#] $p < 0,05$ e ^{###} $p < 0,001$ versus controle *pair fed*.

As concentrações plasmáticas de triacilgliceróis em ratos portadores de tumor Walker-256 aumentaram a partir do 8º dia quando comparada ao grupo controle e também a partir do 5º dia em relação ao grupo controle *pair fed*. Em contraste, os animais controle *pair fed* mostraram redução, em todos os dias analisados, nos triacilgliceróis plasmáticos em relação ao grupo controle (figura 2). O aumento nos triacilgliceróis foi de 119% no 8º dia, 152% no 11º dia e 147% no 14º dia de tumor em relação ao controle.

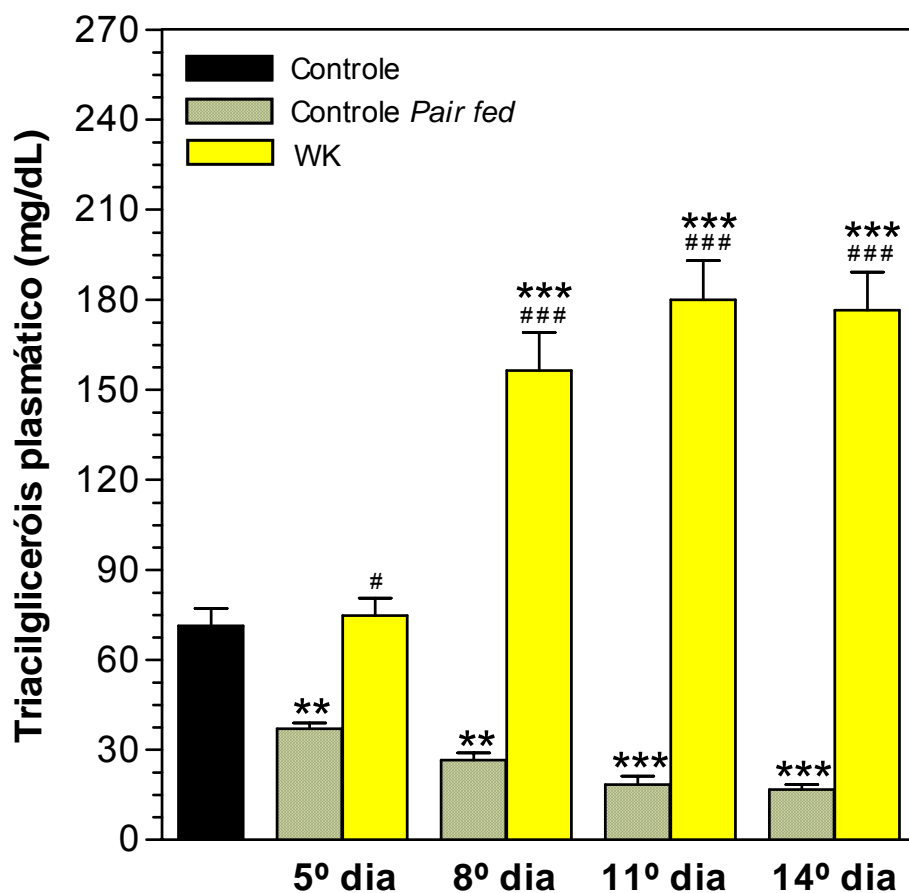


Figura 2 – Concentrações de triacilgliceróis plasmático de ratos controle, controle *pair fed* e portadores de tumor Walker-256 no 5º, 8º, 11º e 14º dias após a inoculação das células tumorais. Cada barra representa a média \pm erro padrão da média de 9 a 16 experimentos. Resultados analisados por ANOVA One-Way seguida de Newman-Keuls. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ versus controle, # $p < 0,05$ e ### $p < 0,001$ versus controle *pair fed*.

Os animais portadores de tumor Walker-256 apresentaram aumento nas concentrações de ácidos graxos livres plasmático apenas no 14º dia comparado ao controle, cerca de 78%, porém houve aumento nos ácidos graxos livres já no 11º dia de tumor em relação ao controle *pair fed*. Não houve alteração dos ácidos graxos livres plasmático entre os grupos controle *pair fed* e controle (figura 3).

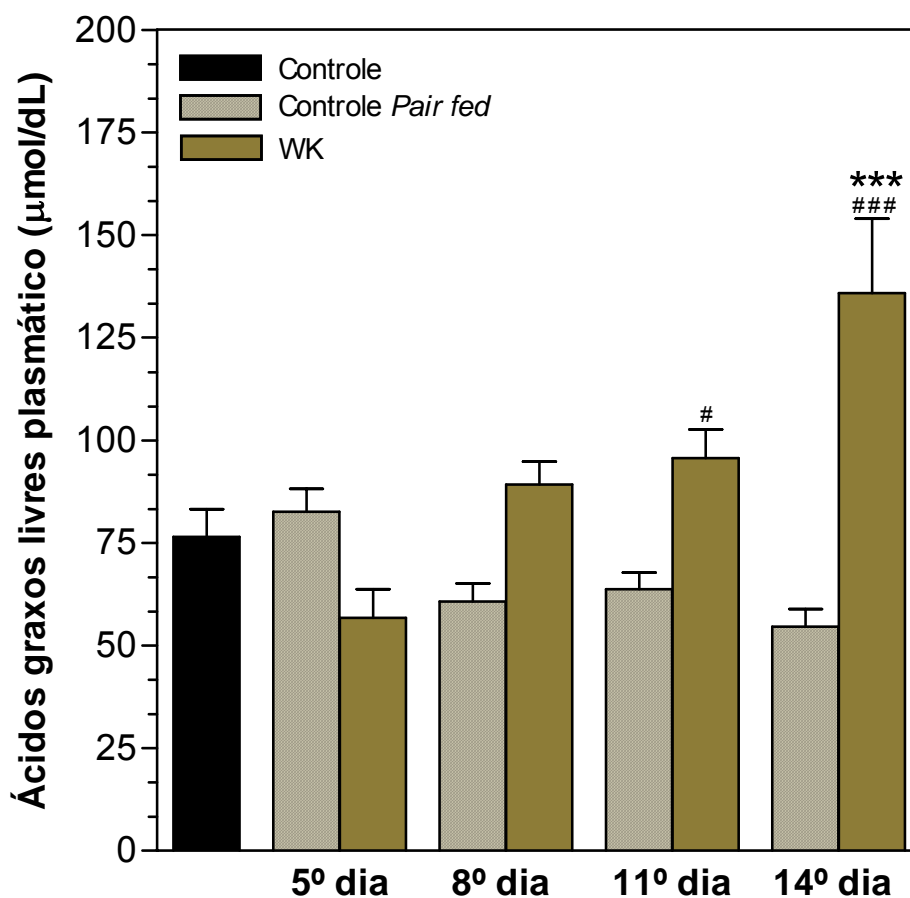


Figura 3 – Concentrações de ácidos graxos livres plasmático de ratos controle, controle *pair fed* e portadores de tumor Walker-256 no 5º, 8º, 11º e 14º dias após a inoculação das células tumorais. Cada barra representa a média \pm erro padrão da média de 9 a 15 experimentos. Resultados analisados por ANOVA One-Way seguida de Newman-Keuls. *** $p < 0,001$ versus controle, # $p < 0,05$ e ### $p < 0,001$ versus controle *pair fed*.

4.3 AVALIAÇÃO DE PRECURSORES NEOGLICOGÊNICOS PLASMÁTICOS

As concentrações de glicerol no plasma mantiveram-se inalteradas ao longo do desenvolvimento do tumor e no grupo controle *pair fed* em relação ao controle. Somente no 14º dia houve aumento de glicerol plasmático em relação ao grupo controle *pair fed* correspondente (figura 4).

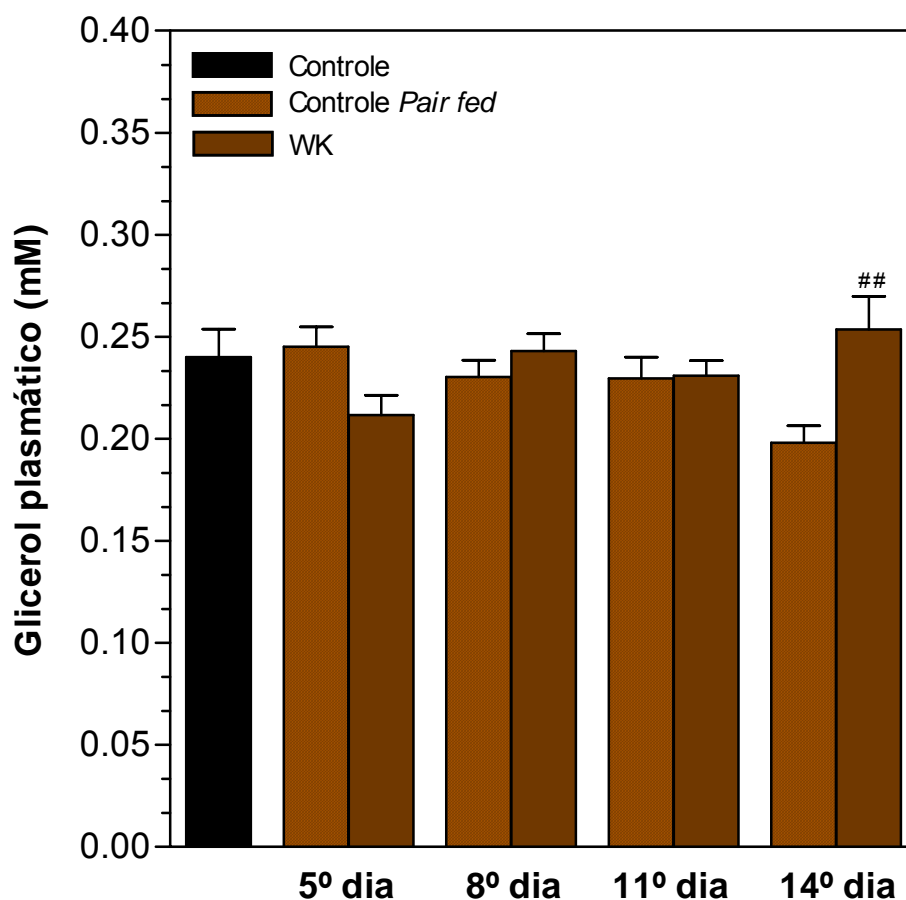


Figura 4 – Concentrações de glicerol plasmático de ratos controle, controle *pair fed* e portadores de tumor Walker-256 no 5º, 8º, 11º e 14º dias após a inoculação das células tumorais. Cada barra representa a média \pm erro padrão da média de 8 a 15 experimentos. Resultados analisados por ANOVA One-Way seguida de Newman-Keuls. ^{##} $p < 0,01$ versus controle *pair fed*.

No que se refere ao lactato plasmático, houve aumento progressivo de sua concentração a partir do 8º dia de desenvolvimento tumoral tanto em relação ao grupo controle como em relação ao grupo controle *pair fed* correspondente (figura 5), e nenhuma alteração foi observada no grupo controle *pair fed* quando comparada ao controle. O aumento no lactato foi de 128%, 218% e 282% respectivamente no 8º, 11º e 14º dias de tumor em relação ao grupo controle.

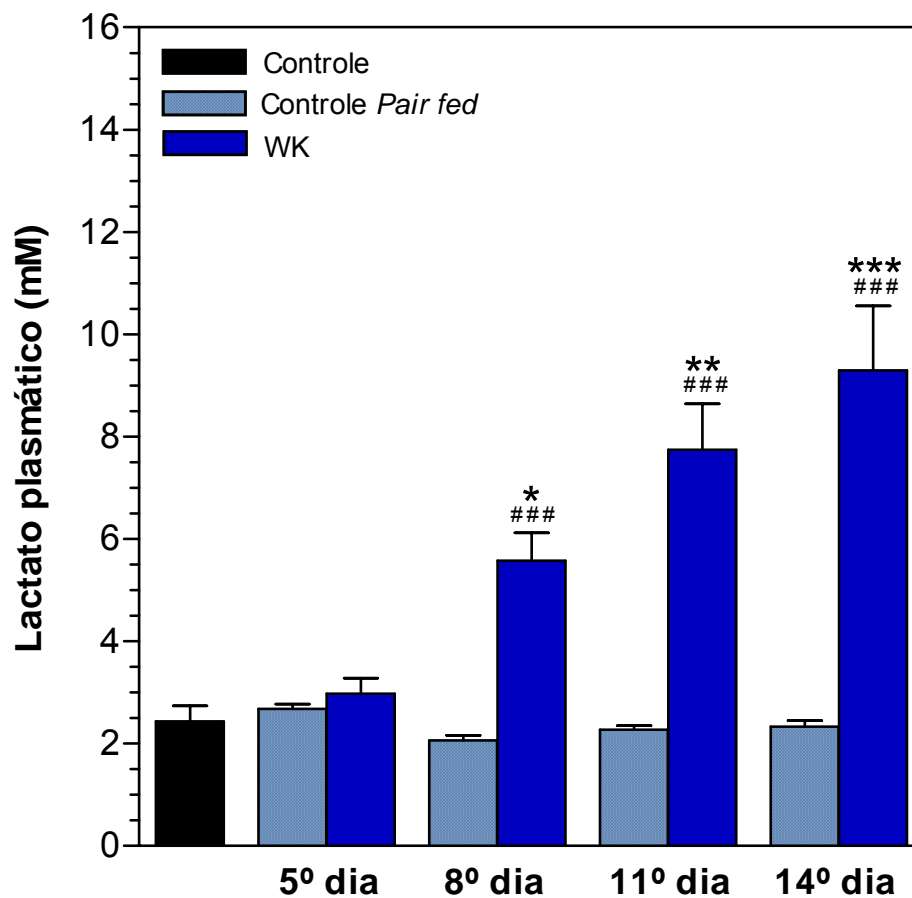


Figura 5 – Concentrações de lactato plasmático de ratos controle, controle *pair fed* e portadores de tumor Walker-256 no 5º, 8º, 11º e 14º dias após a inoculação das células tumorais. Cada barra representa a média \pm erro padrão da média de 10 a 13 experimentos. Resultados analisados por Kruskal Wallis seguido por teste de Dunn. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ versus controle, # # # $p < 0,001$ versus controle *pair fed*.

4.4 AVALIAÇÃO DA UREMIA

Houve aumento significativo (231%) da concentração de uréia plasmática somente no 14º dia após a inoculação das células Walker-256, embora haja tendência de aumento ao longo do desenvolvimento tumoral (5º, 8º e 11º dias) em relação ao grupo controle. Este indicativo é apoiado pela elevação da uréia plasmática nos portadores de tumor desde o 8º dia em relação ao grupo controle *pair fed* correspondente (figura 6), entretanto, não há diferenças entre as

concentrações de uréia plasmática entre animais dos grupos controle *pair fed* e controle.

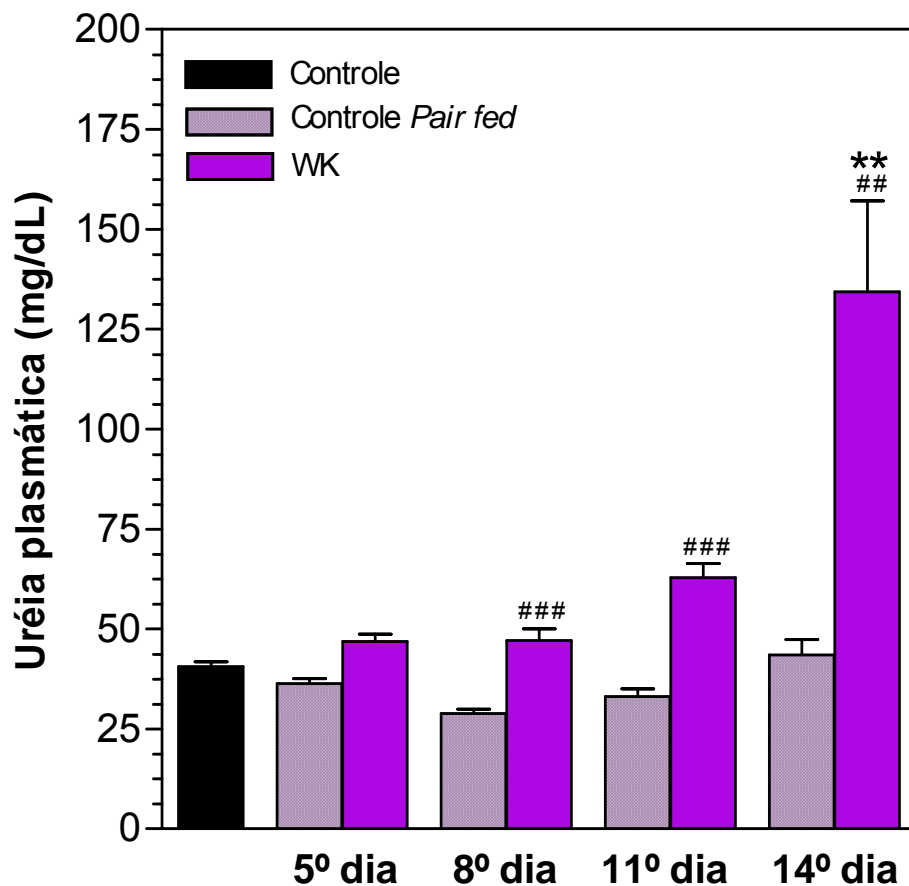


Figura 6 – Concentrações de uréia plasmática de ratos controle, controle *pair fed* e portadores de tumor Walker-256 no 5º, 8º, 11º e 14º dias após a inoculação das células tumorais. Cada barra representa a média \pm erro padrão da média de 9 a 15 experimentos. Resultados analisados por Kruskal Wallis seguido por teste de Dunn. ** $p < 0,01$ versus controle, ## $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$ versus controle *pair fed*.

4.5 AVALIAÇÃO DA GLICEMIA

Desde as fases iniciais de desenvolvimento da caquexia, e também no grupo controle *pair fed*, as glicemias reduziram em relação ao grupo controle, alcançando redução de 56% no 14º dia de tumor. A queda glicêmica nos portadores de tumor teve nível de significância maior que o controle *pair fed* correspondente a

partir do 8º dia, apresentando-se diminuída, em aproximadamente 41%, em relação a este no 14º dia após inoculação das células Walker-256 (figura 7).

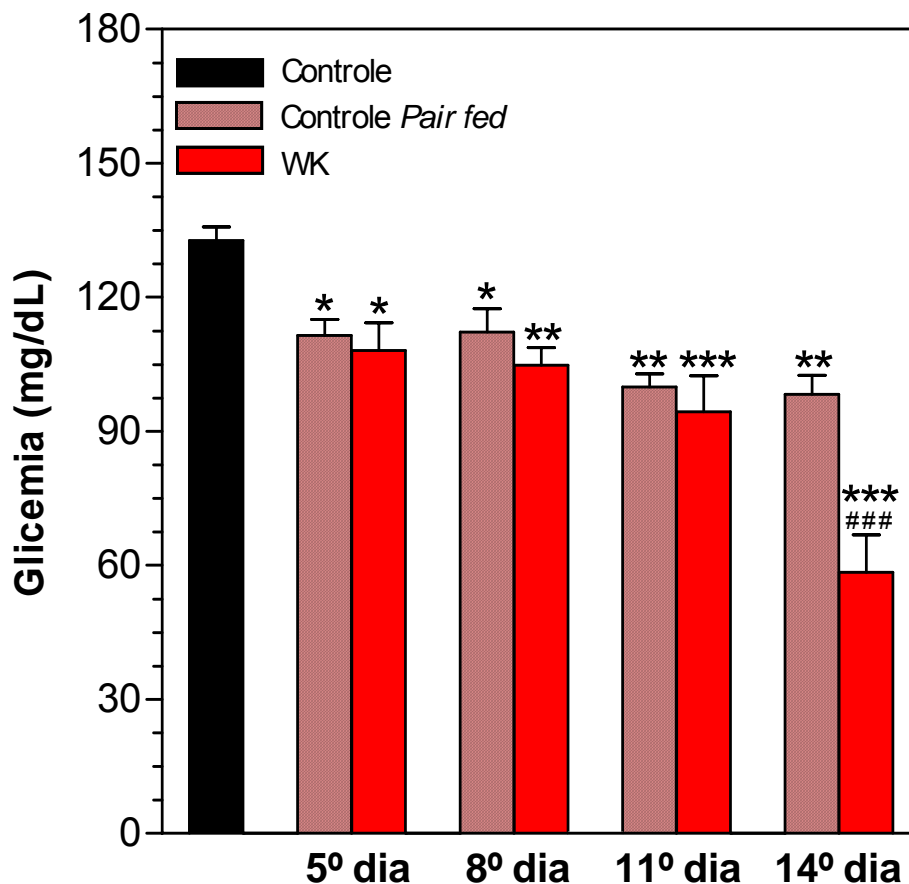


Figura 7 – Glicemia de ratos controle, controle *pair fed* e portadores de tumor Walker-256 no 5º, 8º, 11º e 14º dias após a inoculação das células tumorais. Cada barra representa a média \pm erro padrão da média de 9 a 15 experimentos. Resultados analisados por ANOVA One-Way seguida de Newman-Keuls. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ versus controle, ### $p < 0,001$ versus controle *pair fed*.

4.6 AVALIAÇÃO DO CONTEÚDO DE GLICOGÊNIO HEPÁTICO

Os animais do grupo tumor apresentaram menor conteúdo de glicogênio hepático em relação ao grupo controle, exceto no 8º dia, ainda que este apresente tendência de redução, atingindo diminuição de 94% do conteúdo de glicogênio no 14º dia de tumor. Os animais do grupo controle *pair fed* mostraram redução do glicogênio hepático a partir do 11º dia da restrição de ingestão alimentar,

embora a tendência apareça desde ao 5º dia. Não houve diferença entre o conteúdo de glicogênio do grupo tumor e controle *pair fed* para todos os dias analisados (figura 8).

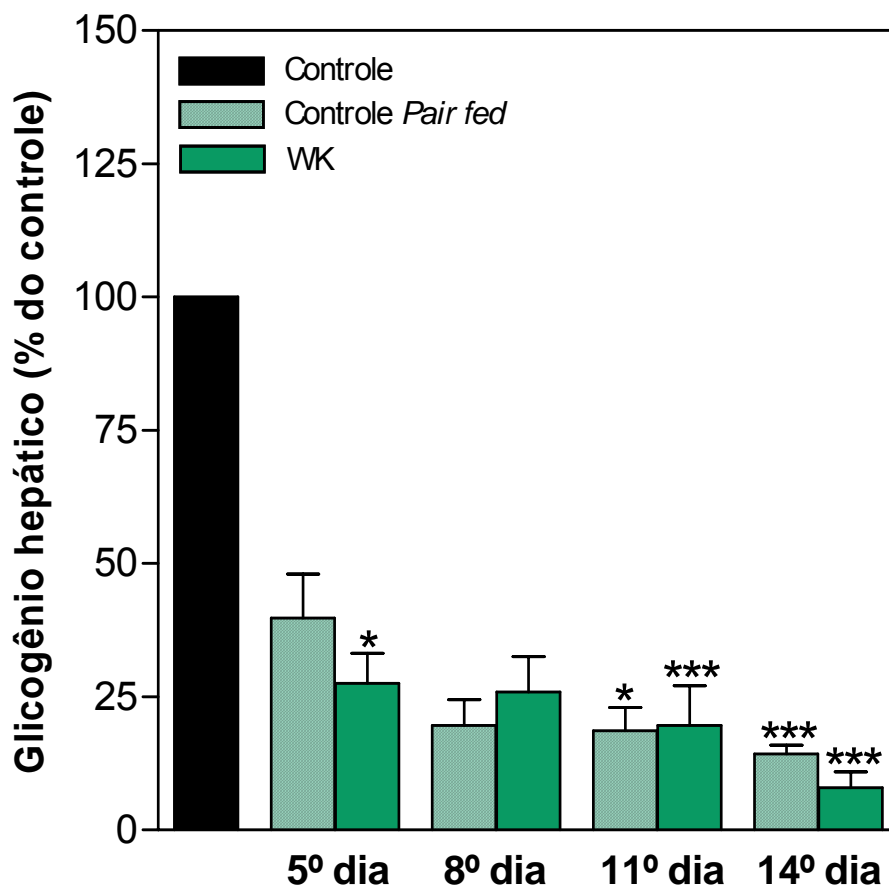


Figura 8 – Percentagem de conteúdo de glicogênio hepático em relação ao controle de ratos controle *pair fed* e portadores de tumor Walker-256 no 5º, 8º, 11º e 14º dias após a inoculação das células tumorais. Cada barra representa a média \pm erro padrão da média de 5 a 20 experimentos. Resultados analisados por Kruskal Wallis seguido por teste de Dunn. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ versus controle.

4.7 AVALIAÇÃO DA NEOGLICOGÊNESE E DO CONSUMO DE OXIGÊNIO HEPÁTICOS A PARTIR DE VÁRIOS PRECURSORES DE GLICOSE

A neoglicogênese e o consumo de oxigênio dos animais no 12º dia de desenvolvimento do tumor Walker-256 e dos animais do grupo controle, sem tumor, ambos com 24 horas de privação alimentar, foram avaliados em fígados submetidos à perfusão com os seguintes substratos neoglicogênicos: L-alanina 2,5

mM, piruvato 5 mM, L-lactato 2 mM e 8 mM e glicerol 2 mM. Nos experimentos de perfusão com L-alanina, foram também analisadas as produções hepáticas de uréia, piruvato e lactato.

Os valores basais de produção de glicose, observados nos 10 primeiros minutos de perfusão, os quais correspondem à liberação de glicose proveniente do glicogênio hepático residual, pós-privação alimentar de 24 horas, foram semelhantes nos dois grupos (figuras 9A, 11A, 12A, 13A e 14A). Entretanto, os valores basais de consumo de oxigênio foram menores (12C, 13C e 14C) ou tenderam a serem menores (9C e 11C) nos animais portadores de tumor.

A infusão dos precursores neoglicogênicos no fígado no 10º minuto do período de perfusão promoveu aumento na produção de glicose e no consumo de oxigênio nos animais controle e portadores de tumor (figuras 9, 11, 12, 13 e 14), os quais tenderam a retornar aos seus valores basais quando a infusão do precursor foi interrompida.

Entretanto, o aumento na produção de glicose e consumo de oxigênio hepáticos a partir do precursor L-alanina 2,5 mM foi menor nos animais portadores de tumor (figuras 9A e 9C), como demonstrado pelas áreas sob as curvas (AUCs) (figuras 9B e 9D). Houve redução de 58% na AUC da produção de glicose e de 56% no consumo de oxigênio nos animais portadores de caquexia.

A infusão de L-alanina 2,5 mM também elevou a produção hepática de uréia, piruvato e lactato em ambos os grupos (figuras 10A, 10B e 10C), porém o aumento da produção de uréia e piruvato pelo fígado de ratos portadores de tumor foi reduzido em relação ao controle, e não houve alteração na produção hepática de lactato, como demonstrado pela análise das AUCs (figura 10D).

Similarmente, embora menos acentuados, a produção de glicose e o consumo de oxigênio foram menores nos animais portadores de tumor (figuras 11A e 11C), quando o precursor neoglicogênico infundido no fígado foi o piruvato 5 mM, como evidenciado pelas AUCs (figuras 11B e 11C). As AUCs do grupo tumor foram reduzidas em 33% para a produção de glicose e 27% para o consumo de oxigênio.

Da mesma maneira, houve inibição da neoglicogênese hepática e do consumo de oxigênio a partir do L-lactato 2 mM nos animais portadores de tumor (figuras 12A e 12C). Como pode ser observado pelas AUCs (figuras 12B e 12D), houve diminuição de 26% da AUC para produção de glicose e de 40% para consumo de oxigênio.

Diferentemente dos demais precursores neoglicogênicos, a infusão de glicerol 2 mM resultou em aumento semelhante da produção de glicose e consumo de oxigênio em fígados de animais portadores de tumor e animais controles (figura 14).

O L-lactato 8 mM também foi capaz de estimular a neoglicogênese hepática e o consumo de oxigênio pelo fígado (figuras 13A e 13C) de forma similiar nos dois grupos, como mostrado nas AUCs (figuras 13B e 13D). Vale ressaltar que esta concentração de lactato, 8 mM, é semelhante à encontrada no sangue dos ratos com tumor, 11 dias após a inoculação das células Walker-256.

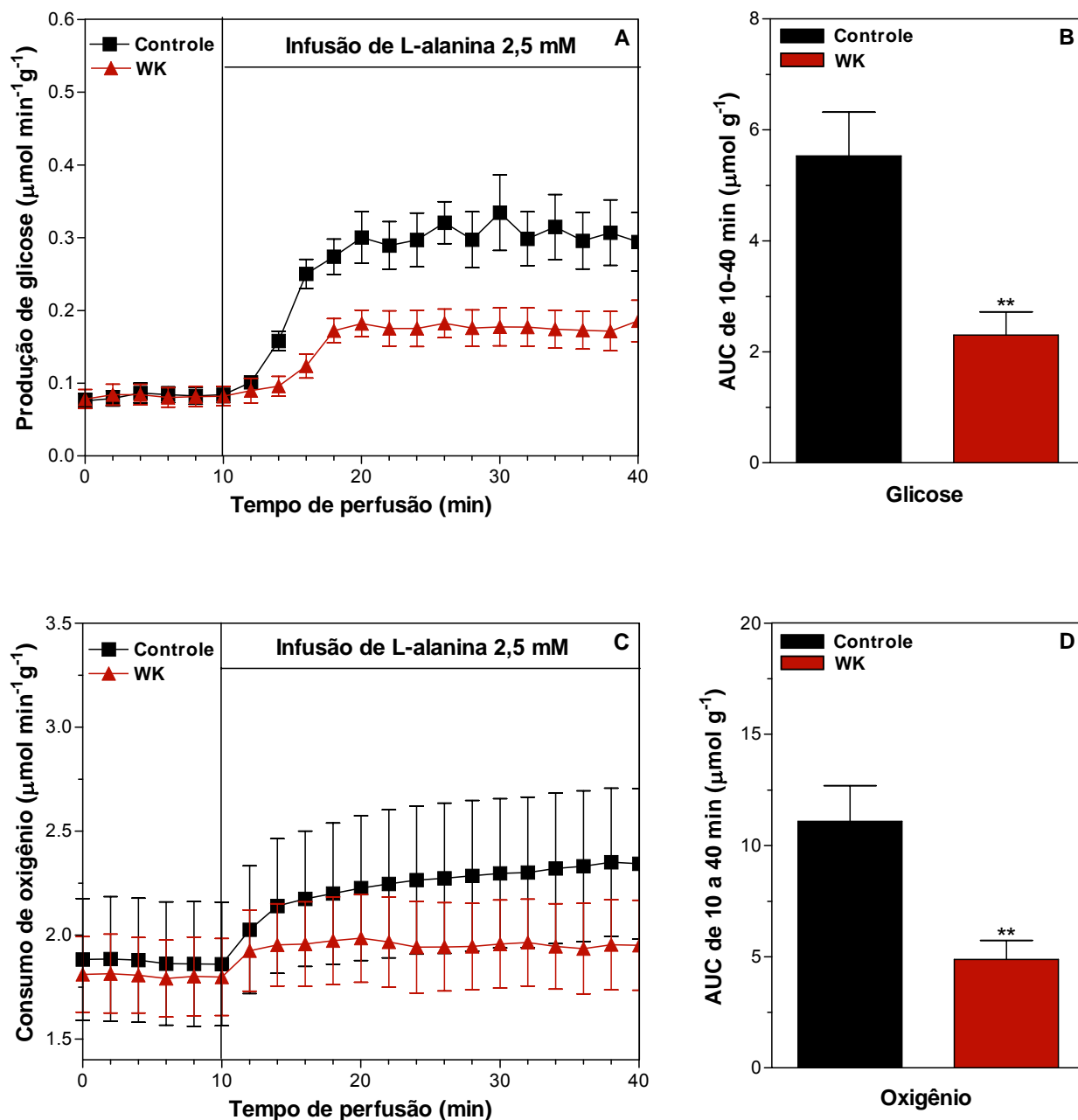


Figura 9 – Produção de glicose (A), consumo de oxigênio (C) e as respectivas áreas sob as curvas (AUCs) (B e D) em fígados de ratos portadores de tumor Walker-256 (WK) e controles durante a infusão de L-alanina 2,5 mM. Fígados de ratos com 24 horas de privação alimentar foram submetidos à perfusão *in situ* como descrito em Material e Métodos. L-alanina 2,5 mM foi infundida no intervalo entre 10 e 40 minutos. Cada ponto representa a média \pm erro padrão da média de 5 a 7 experimentos. Diferenças entre as AUCs dos grupos tumor Walker-256 e controle analisadas pelo teste t de Student não-pareado. ** $p < 0,01$ versus controle.

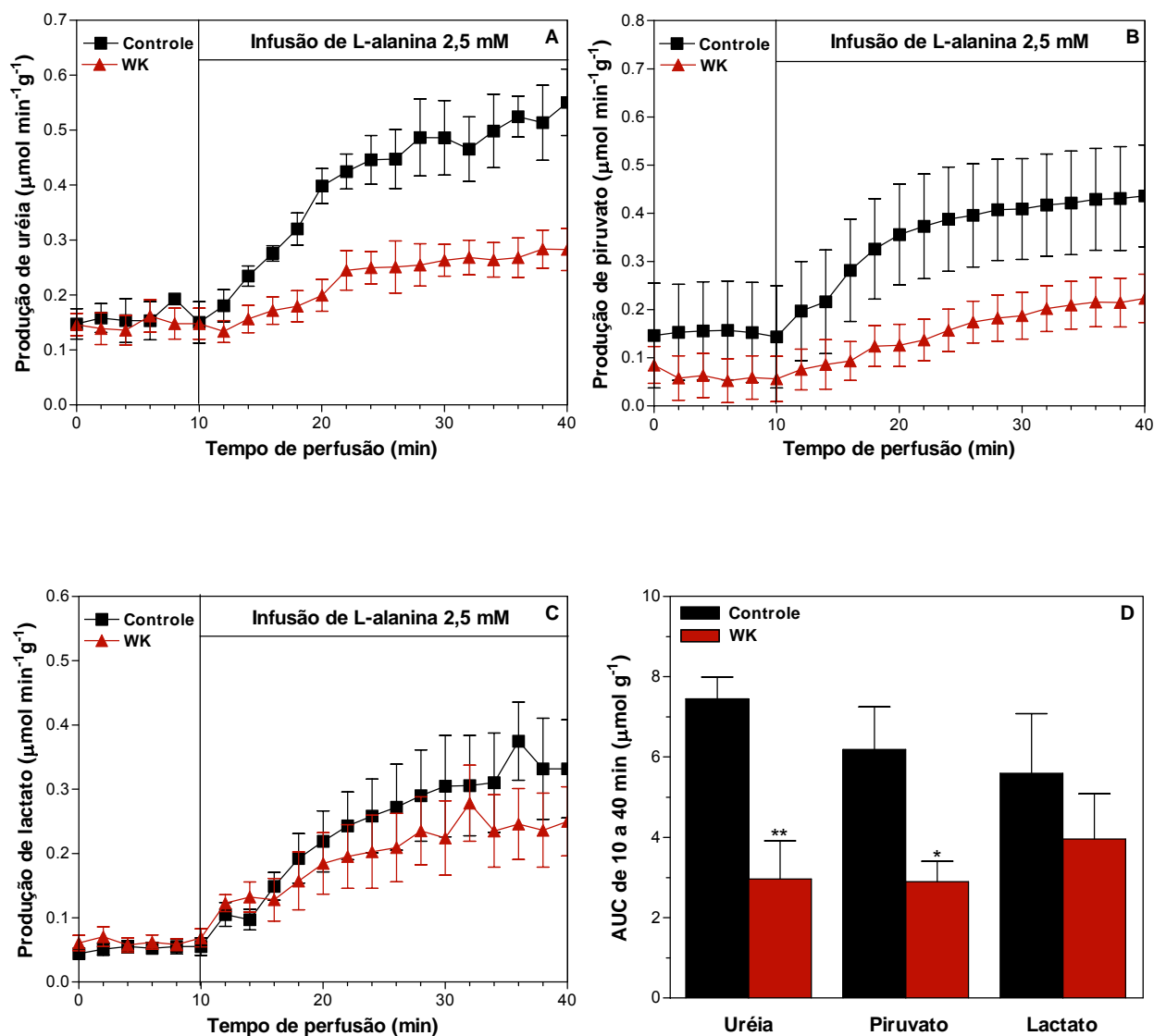


Figura 10 – Produções hepáticas de uréia, piruvato e lactato (A, B e C) e as respectivas áreas sob as curvas (D) em ratos portadores de tumor Walker-256 (WK) e controles durante a infusão de L-alanina 2,5 mM. Fígados de ratos com 24 horas de privação alimentar foram submetidos à perfusão *in situ* como descrito em Material e Métodos. L-alanina 2,5 mM foi infundida no intervalo entre 10 e 40 minutos. Cada ponto representa a média \pm erro padrão da média de 4 a 7 experimentos. Diferenças entre as AUCs dos grupos tumor Walker-256 e controle analisadas pelo teste t de Student não-pareado. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ versus controle.

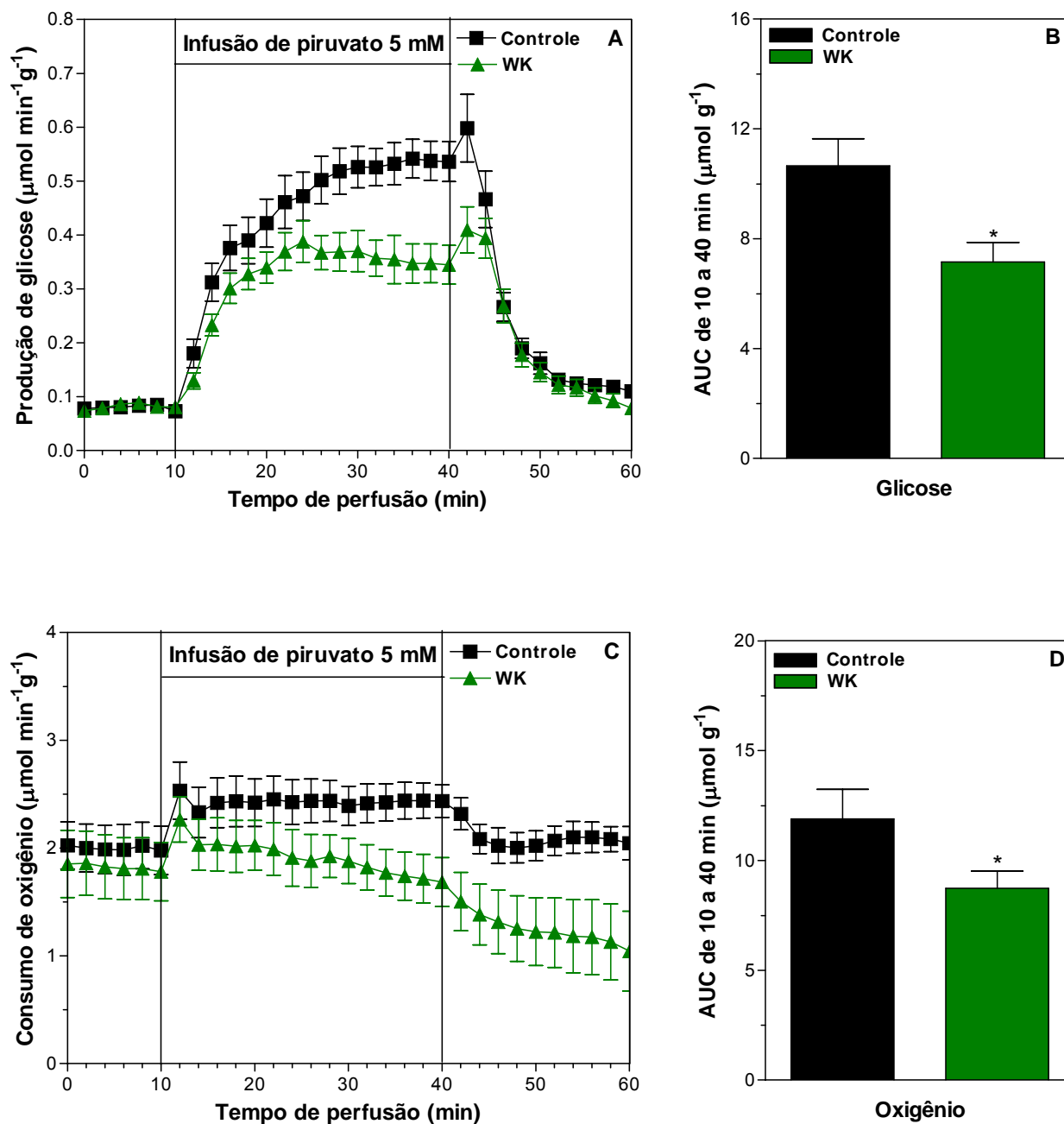


Figura 11 – Produção de glicose (A), consumo de oxigênio (C) e as respectivas áreas sob as curvas (AUCs) (B e D) em fígados de ratos portadores de tumor Walker-256 (WK) e controles durante a infusão de piruvato 5 mM. Fígados de ratos com 24 horas de privação alimentar foram submetidos à perfusão *in situ* como descrito em Material e Métodos. Piruvato 5 mM foi infundido no intervalo entre 10 e 40 minutos. Cada ponto representa a média \pm erro padrão da média de 6 a 8 experimentos. Diferenças entre as AUCs dos grupos tumor Walker-256 e controle analisadas pelo teste t de Student não-pareado. * $p < 0,05$ versus controle.

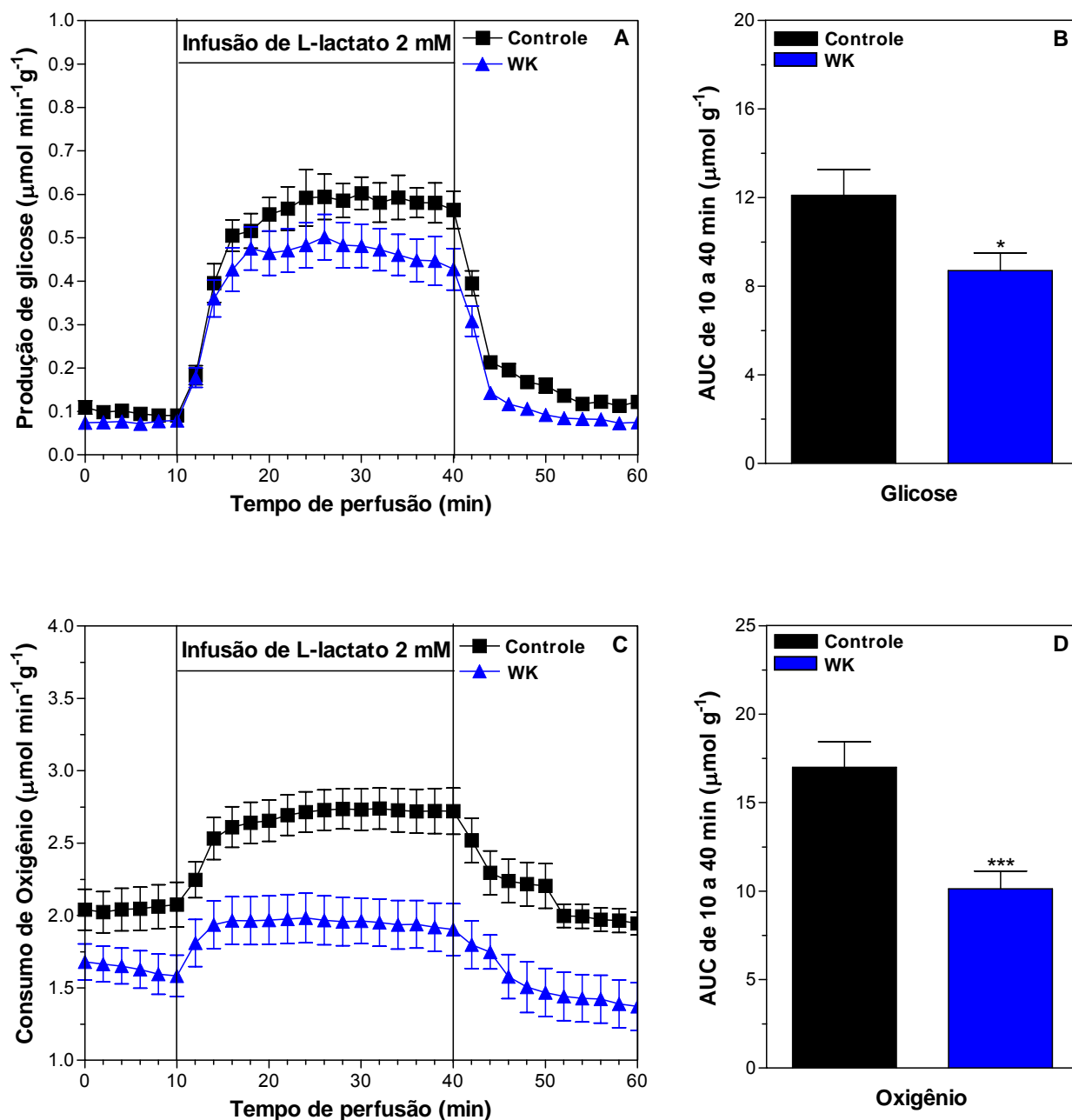


Figura 12 – Produção de glicose (A), consumo de oxigênio (C) e as respectivas áreas sob as curvas (AUCs) (B e D) em fígados de ratos portadores de tumor Walker-256 (WK) e controles durante a infusão de L-lactato 2 mM. Fígados de ratos com 24 horas de privação alimentar foram submetidos à perfusão *in situ* como descrito em Material e Métodos. L-lactato 2 mM foi infundido no intervalo entre 10 e 40 minutos. Cada ponto representa a média \pm erro padrão da média de 8 a 12 experimentos. Diferenças entre as AUCs dos grupos tumor Walker-256 e controle analisadas pelo teste t de Student não-pareado. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ versus controle.

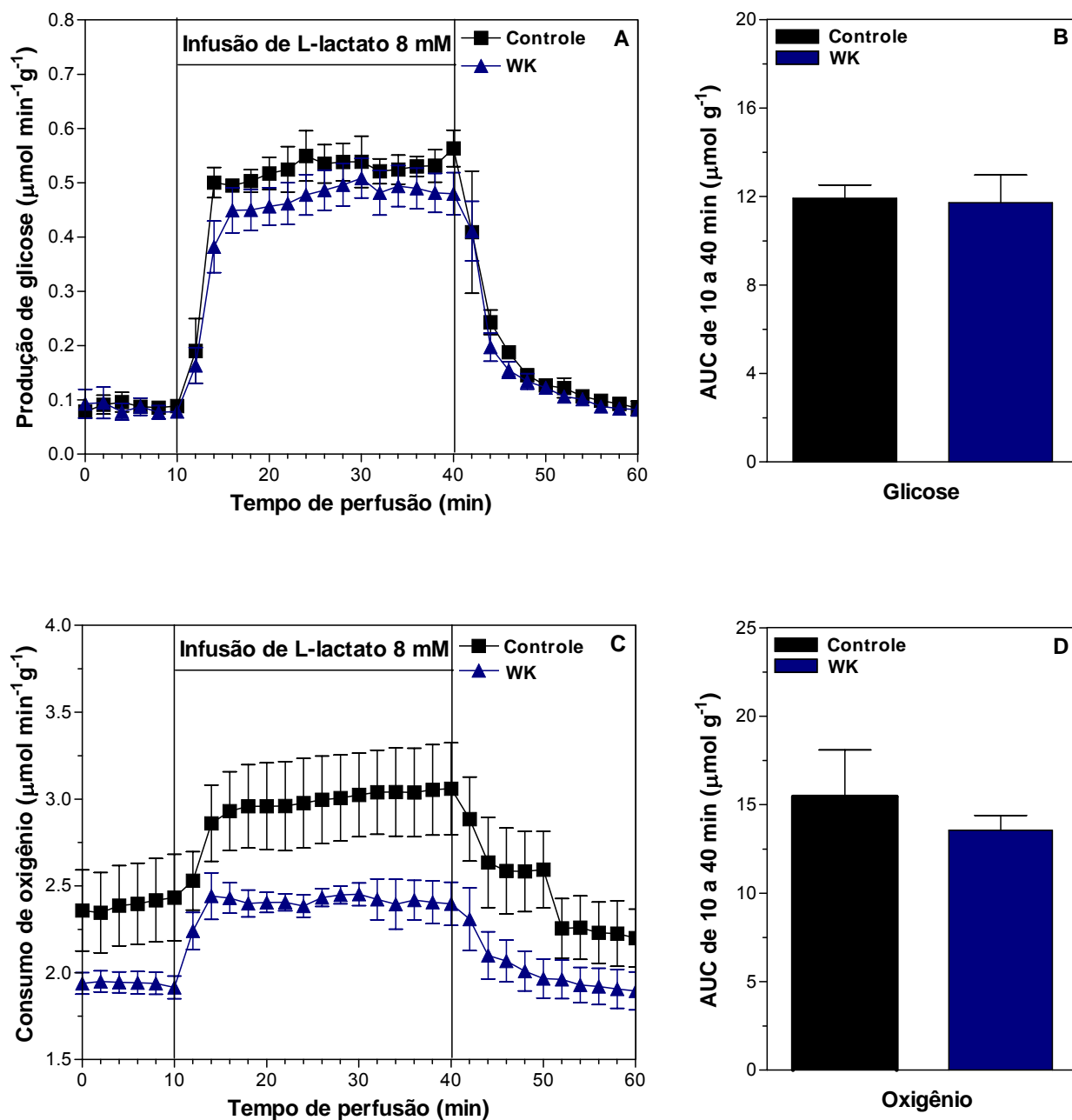


Figura 13 – Produção de glicose (A), consumo de oxigênio (C) e as respectivas áreas sob as curvas (AUCs) (B e D) em fígados de ratos portadores de tumor Walker-256 (WK) e controles durante a infusão de L-lactato 8 mM. Fígados de ratos com 24 horas de privação alimentar foram submetidos à perfusão *in situ* como descrito em Material e Métodos. L-lactato 8 mM foi infundido no intervalo entre 10 e 40 minutos. Cada ponto representa a média \pm erro padrão da média de 5 a 7 experimentos. Diferenças entre as AUCs dos grupos tumor Walker-256 e controle analisadas pelo teste t de Student não-pareado.

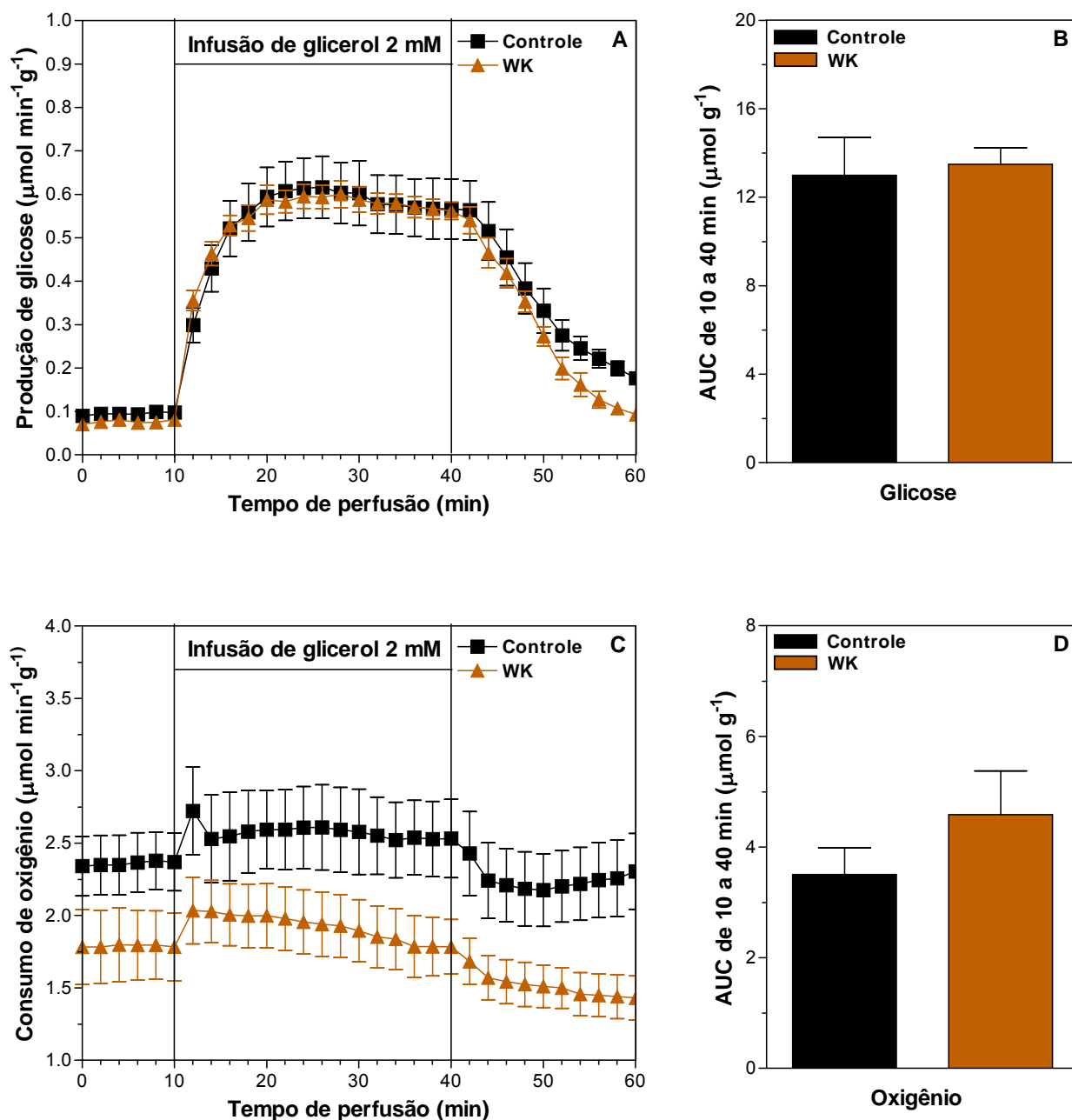


Figura 14 – Produção de glicose (A), consumo de oxigênio (C) e as respectivas áreas sob as curvas (AUCs) (B e D) em fígados de ratos portadores de tumor Walker-256 (WK) e controles durante a infusão de glicerol 2 mM. Fígados de ratos com 24 horas de privação alimentar foram submetidos à perfusão *in situ* como descrito em Material e Métodos. Glicerol 2 mM foi infundido no intervalo entre 10 e 40 minutos. Cada ponto representa a média \pm erro padrão da média de 5 a 6 experimentos. Diferenças entre as AUCs dos grupos tumor Walker-256 e controle analisadas pelo teste t de Student não-pareado.

Discussão

5 DISCUSSÃO

A implantação do tumor Walker-256 em ratos tem sido considerada um bom modelo experimental para estudar a síndrome da caquexia no câncer (GUAITANI *et al.*, 1982), pois é uma neoplasia bem caracterizada, com crescimento rápido e uniforme, facilmente mantida em laboratório, que raramente apresenta regressões e com eficiência comprovada em testes terapêuticos (MORAES *et al.*, 1997; OLIVEIRA *et al.*, 1998).

Em nossos estudos (tabela1), houve aumento acelerado e progressivo das massas tumorais do flanco, das metástases e, conseqüentemente, da massa tumoral total após a inoculação das células tumorais. A massa tumoral total foi equivalente a 16% do peso do animal no 14º dia após a inoculação das células Walker-256. Estes resultados confirmam dados prévios da literatura de que este carcinossarcoma é de crescimento rápido (VICENTINO *et al.*, 2002a).

Desde a fase inicial, ou seja, no 5º dia após a inoculação das células Walker-256, ratos portadores de tumor apresentaram perda de massa corpórea de aproximadamente 10% (tabela 1), valor que caracteriza a presença de caquexia nesses animais, a qual se agravou ao longo do tempo. Estes achados evidenciam o estabelecimento deste modelo experimental de caquexia em nosso laboratório.

Embora sejam considerados caquéticos logo de início, houve redução da massa muscular esquelética, mensurada pela massa do músculo gastrocnêmio, e da ingestão alimentar somente a partir do 11º dia após a inoculação das células tumorais (tabela 1), demonstrando a sarcopenia e a presença de anorexia nesses animais nos estágios mais tardios do desenvolvimento tumoral.

A redução da massa muscular esquelética pode ter sido decorrente da elevada degradação e/ou da reduzida síntese protéica (TISDALE, 1999, 2000) e/ou da apoptose celular (ARGILÉS *et al.*, 2005), promovidas por citocinas (TNF- α , IL-6, IL-1 e INF- γ) e outros fatores como o PIF (KOTLER, 2000; LOBERG *et al.*, 2007). Diversos estudos têm demonstrado que as citocinas e o PIF induzem a ativação de vias proteolíticas, principalmente da via ubiquitina-proteassoma (TISDALE, 2001, 2002, 2003) e que o PIF (TISDALE, 2000, 2001) e toxormônios (RUBIN, 2003) produzidos pelo tumor reduzem a síntese protéica muscular esquelética.

A perda de massa corpórea na ausência de redução da ingestão alimentar no início do desenvolvimento tumoral (tabela 1) e a não alteração da massa do músculo gastrocnêmio quando animais sadios foram submetidos a um esquema de alimentação reduzida semelhante aos dos animais com tumor (resultados não mostrados) confirmam dados anteriores (TISDALE, 2002) de que a caquexia associada ao câncer pode ocorrer na ausência da anorexia, o que ressalta a importância dos mediadores da caquexia neste processo. Portanto, a anorexia sozinha não é suficiente para explicar as complexas alterações metabólicas que ocorrem durante a caquexia, inclusive, a suplementação nutricional e a manipulação farmacológica do apetite são incapazes de restaurar o peso e a massa magra corpórea (TISDALE, 2002).

A anorexia, observada nos portadores de tumor (11^o e 14^o dias – tabela 1), provavelmente foi resultante da ação de citocinas periféricas (TNF- α , IL-1, IL-6 e IFN- γ) as quais podem atravessar a barreira hemato-encefálica e ligarem-se a receptores específicos no sistema nervoso central. Cada família de citocina anorexigênica utiliza um sistema de transdução diferente, sugerindo que a anorexia induzida por caquexia é um fenômeno complexo que envolve muitas vias de sinalização (RAMOS *et al.*, 2004).

No intuito de estudar se as possíveis alterações metabólicas plasmáticas presentes na caquexia poderiam ser decorrentes, pelo menos em parte, da anorexia, quatro grupos de animais sadios, porém com alimentação reduzida (animais controle *pair fed*), semelhante à ingestão alimentar dos animais portadores de tumor no 5^o, 8^o, 11^o ou 14^o dias (tabela 1), foram conduzidos.

Considerando que a perda de massa adiposa contabiliza uma grande parte da dramática perda de peso observada no câncer em humanos e em modelos animais, e que o metabolismo lipídico é marcadamente alterado nesta patologia (BERTEVELLO; SEELAENDER, 2001) avaliou-se inicialmente, no presente trabalho, o perfil lipídico plasmático.

Foi possível observar diminuição do colesterol total plasmático em portadores de tumor Walker-256 no 11^o e no 14^o dias do desenvolvimento tumoral apenas em relação aos grupos controle *pair fed* correspondentes, e uma tendência de redução nestes mesmos dias nos grupos tumor em relação ao grupo controle (figura 1). No entanto, Pizato *et al.* (2005) encontraram redução de aproximadamente 43% na concentração plasmática de colesterol total em ratos no

14º dia de desenvolvimento do tumor Walker-256 *versus* controle (animais sem tumor). Segundo Shaw (2006), o estresse energético como hipoglicemia e estresse oxidativo, presentes em portadores de câncer, eleva a concentração intracelular de adenosina monofosfato (AMP), a qual ativa a proteína quinase dependente de AMP (AMPK), enzima que inativa a HMG-CoA-redutase, suprimindo a síntese de colesterol.

Em relação aos triacilgliceróis plasmático, em contraste à progressiva redução na sua concentração nos animais controle *pair fed*, os animais Walker-256 apresentaram hipertrigliceridemia a partir do 8º dia da implantação tumoral em relação ao grupo controle (figura 2). Esta elevação da trigliceridemia pode ter sido decorrente da inibição da LPL.

Vários estudos têm mostrado que as citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-6, IL-1 α , INF- α e INF- γ) e os ácidos graxos livres (DELARUE; MAGNAN, 2007; HOTAMISLIGIL, 1999; METER; GRESSNER, 2004; TISDALE, 1999; WARNE, 2003; YU; GINSBERG, 2005) promovem inibição direta da LPL, e também inibição indireta, através do desenvolvimento de resistência insulínica.

A citocina com maior potencial de inibição da LPL é o TNF- α (TISDALE, 1999). O TNF- α pode reduzir diretamente a atividade desta enzima por diminuir sua transcrição gênica, reduzindo a lipogênese e levando à deslipidação de adipócitos maduros (MORIN *et al.*, 1994). Fried e Zechner (1989) demonstraram que o TNF- α suprimiu potencialmente os níveis de RNAm, a taxa de síntese e a atividade da LPL em tecido adiposo humano. Ademais, Uchida *et al.* (1997) observaram que o TNF- α estimula, em adipócitos do tecido adiposo marrom, a expressão da NO sintase induzível, seguido pela produção de NO, o qual medeia o efeito supressor do TNF- α na atividade da LPL através da produção de guanosina monofosfato cíclica (GMPc).

O TNF- α pode ainda indiretamente, via resistência insulínica, reduzir a atividade da LPL, visto que a insulina é o principal regulador positivo (*upregulation*) da síntese e atividade da LPL no tecido adiposo (YU; GINSBERG, 2005). No estado de resistência insulínica ocorre depleção dos estoques de gordura tanto pela menor hidrólise de triacilgliceróis dos quilomicrons (redução da lipogênese) mediada pela LPL, quanto por inibição não efetiva da lipólise no tecido adiposo mediada pela HSL (YU; GINSBERG, 2005), o que implica no acúmulo de triacilgliceróis circulantes.

Além de inibição da LPL, o TNF- α pode elevar os triacilgliceróis circulantes por alterar a expressão de outras citocinas envolvidas no metabolismo lipídico, como a IL-1 e IL-6 (YU; GINSBERG, 2005; VAN HALL *et al.*, 2003), por inibir várias enzimas envolvidas na síntese de gorduras (PAPE; KIM, 1988; PEKALA *et al.*, 1983; TORTI *et al.*, 1985) e por estimular a lipogênese e formação de VLDL no fígado (GRUNFELD; PALLADINO *apud* BULLÓ-BONET *et al.*, 1999).

No que se refere aos ácidos graxos livres plasmáticos, houve aumento apenas no 14º dia de tumor em relação aos animais controle (figura 3). Como não houve diferença entre os grupos controle *pair fed* e controle pode-se constatar que o aumento encontrado foi causado pela presença do tumor e não pela anorexia.

O aumento nos ácidos graxos circulantes dos animais com tumor provavelmente foi devido à maior mobilização das reservas de tecido adiposo, e têm sido freqüentemente relacionado com o envolvimento de citocinas. As citocinas TNF- α , IL-6, IL-1 α e o INF- γ podem ativar a HSL, enzima que estimula a hidrólise dos triacilgliceróis do tecido adiposo (ARNER, 1995), como já mencionado.

Além das citocinas, outro fator que pode ter contribuído para a elevação dos ácidos graxos é o LMF liberado pelo tumor ou pelas metástases. O LMF age de maneira similar a dos hormônios lipolíticos, através da elevação intracelular de AMPc, mediada por receptor β 3-adrenérgico (TISDALE, 1997, 2003, 2004), e conseqüente fosforilação e ativação da HSL (McGARRY, 1997). O LMF é, então, um dos responsáveis pela perda de massa adiposa no processo de caquexia no câncer, por manter a taxa de lipólise maior do que a de lipogênese, agindo diretamente no tecido adiposo liberando ácidos graxos livres e glicerol (TISDALE, 1997, 2003, 2004). Como o LMF, o TNF- α estimula a lipólise por elevação intracelular de AMPc, através da ativação de quinases reguladas por sinal extracelular (ZHANG *et al.*, 2002).

O aumento dos ácidos graxos plasmáticos nos animais portadores do tumor pode também ter ocorrido pela menor capacidade de sua oxidação pelo fígado, em decorrência da menor atividade das CATs, enzimas responsáveis pelo transporte de ácidos graxos através da membrana mitocondrial interna dos hepatócitos. Um estudo mostrou reduzida atividade principalmente da CAT I (VICENTINO *et al.*, 2002a) enquanto outro (SEELAENDER *et al.*, 1998) encontrou que o componente inibido em ratos portadores de tumor Walker-256 é a CAT II.

As células tumorais parecem também contribuir diretamente para o aumento dos ácidos graxos livres plasmático, não só pela síntese do LMF, mas também pela lipogênese acelerada dessas células, visto que quase todos os cânceres humanos superexpressam constitutivamente o gene da enzima ácido graxo sintase. O início e a manutenção dos altos níveis da ácido graxo sintase em células pré-malignas e malignas são devidos às mudanças na expressão gênica e no metabolismo induzidas pela hipóxia e alta acidez (MENENDEZ; LUPU, 2006).

Embora os dados demonstrem que a elevação dos triacilgliceróis foi mais precoce (8^o dia - figura 2) do que a dos ácidos graxos (14^o dia – figura 3) nos portadores de tumor *versus* controle, sugerindo em um primeiro momento que a inibição da lipogênese possa ter precedido a estimulação da lipólise, esta seqüência temporal pode não ser real face às complexas inter-relações metabólicas entre os tecidos.

É possível que liberação de ácidos graxos dos adipócitos já esteja aumentada em fases mais precoces do desenvolvimento do tumor, antes do 14^o dia, e que os mesmos estejam sendo utilizados como fonte de energia pelas células do hospedeiro (MULLIGAN *et al.*, 1992) e do tumor. Estudos têm demonstrado que um aumento de ácidos graxos diminui a utilização de glicose pelas células do hospedeiro por meio do ciclo de Randle (RANDLE *apud* DELARUE; MAGNAN, 2007), um mecanismo poupador de glicose que favoreceria a sua utilização pelas células tumorais. Adicionalmente, os ácidos graxos se tornam os principais combustíveis das células do hospedeiro e do tumor quando a glicose não supre eficazmente o gasto de energia (LANGSTEIN; NORTON, 1991). É possível também que a não elevação dos ácidos graxos plasmáticos nos dias 5, 8 e 11 após a inoculação das células tumorais *versus* controle, se deva a sua utilização na síntese de triacilgliceróis no fígado, os quais são exportados dos hepatócitos como VLDL.

O aumento da lipólise em pacientes com câncer resulta, além do aumento de ácidos graxos circulantes, em liberação de glicerol pelos adipócitos. Entretanto, no presente estudo não houve diferença no glicerol plasmático entre os grupos portadores de tumor e controle. Houve aumento na sua concentração apenas no 14^o dia de tumor em relação aos animais controle *pair fed* (figura 4), evidenciando que esta elevação não foi decorrente da diminuição da ingestão alimentar, visto que há tendência de redução nos animais controle *pair fed*. Seria esperado, pela ativação da HSL causada pelo LMF, TNF- α e outras citocinas, um aumento na

concentração de glicerol no plasma no 14^o dia de tumor correspondente à elevação dos ácidos graxos livres (figura 3). Porém, isto não foi observado e provavelmente se deve ao fato que o glicerol liberado dos adipócitos pode estar sendo utilizado como precursor neoglicogênico pelo fígado, para produção de glicose, que é a principal fonte energética para o tumor.

Tumores de crescimento rápido, como o Walker-256, tendem a ter pobre suprimento sanguíneo o que pode levar o tumor à baixa oxigenação e utilização preferencial da via glicolítica anaeróbica para a produção de energia (PIFFAR *et al.*, 2003; VICENTINO *et al.*, 2002b). A hipóxia desvia o fluxo metabólico da célula tumoral para a via glicolítica anaeróbica através da ativação do fator induzido por hipóxia (HIF) (BRAHIMI-HORN *et al.*, 2007) o qual aumenta a expressão: a) de transportadores de glicose (GLUT-1 e GLUT-3), para aumentar a captação de glicose; b) da enzima piruvato desidrogenase quinase-1, que fosforila e inibe o complexo piruvato desidrogenase, logo, suprime o metabolismo do piruvato pelo ciclo de Krebs e a fosforilação oxidativa; c) da enzima que converte o piruvato a lactato, a lactato desidrogenase-A; d) do transportador monocarboxilato-4 H⁺/lactato, o qual expulsa da célula o íon H⁺ e o lactato; e) de duas isoformas de lançadeiras Na⁺/H⁺ (NHE), NHE-1 e NHE-6, responsáveis por transportar o H⁺ para o exterior da célula em antiporte com o Na⁺; e f) da anidrase carbônica IX, que contribui para expulsar o H⁺ da célula tumoral, quando acoplada aos transportadores de bicarbonato, desempenhando também papel importante na manutenção do pH intracelular da célula tumoral (BRAHIMI-HORN *et al.*, 2007).

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

Em nosso estudo, as concentrações plasmáticas de lactato nos animais Walker-256, diferentemente dos animais controle *pair fed*, foram progressivamente crescentes ao longo do desenvolvimento do tumor (figura 5), atingindo no 14^o dia uma concentração aproximadamente três vezes maior do que o grupo controle. O perfil de aumento do lactato foi semelhante ao encontrado para as massas tumorais (tabela 1) sugerindo que a vascularização do tumor não acompanhou seu rápido crescimento, o que conferiu um microambiente hipóxico às células tumorais.

O lactato plasmático liberado pelas células tumorais é captado e convertido no fígado, pela neoglicogênese, à glicose, a qual é liberada para a corrente sangüínea e utilizada novamente pelo tumor, culminando na produção de mais lactato, estabelecendo-se desse modo um ciclo tumor-fígado, semelhante ao ciclo fútil músculo-fígado que ocorre durante o exercício físico, conhecido como ciclo de Cori (BONGAERTS *et al.*, 2006; LOBERG *et al.*, 2007; TISDALE, 2002). Vale ressaltar que a maior taxa de captação e oxidação de glicose pelas células tumorais (LOBERG *et al.*, 2007; TIJERINA, 2004) e a possível resistência insulínica periférica e hepática do hospedeiro (BOYD, 2003; LOBERG *et al.*, 2007) favorecem a utilização deste substrato energético pelo tumor.

Outro parâmetro metabólico plasmático avaliado no presente trabalho foi a uréia. Ratos portadores do tumor Walker-256 apresentaram aumento na concentração plasmática de uréia no 14^o dia do desenvolvimento tumoral em relação ao grupo controle, mas o aumento mostrou-se significativo desde o 8^o dia em relação aos grupos controle *pair fed* correspondentes (figura 6). Estes resultados confirmam os achados de Corbello-Pereira *et al.* (2004), que sugeriram um acréscimo da atividade ureagênica dos animais com tumor Walker-256, visto que foram observadas maiores concentrações de uréia no plasma.

Entretanto, estudos de perfusão de fígado de ratos com tumor Walker-256 encontraram baixas taxas de produção de uréia a partir dos precursores alanina, alanina + ornitina, amônia, amônia + lactato, amônia + piruvato e glutamina e maiores taxas quando o substrato ureagênico foi a arginina, sugerindo maior atividade da arginase, última enzima do ciclo da uréia que catalisa a hidrólise da arginina em uréia e ornitina (CORBELLO-PEREIRA *et al.*, 2004).

Em outros estudos foi encontrado aumento nos níveis dos aminoácidos leucina, lisina, alanina e valina (NAVARRO *et al.*, 1966), assim como aumento nas concentrações de ornitina, asparagina e arginina (BLAAW *et al.*, 1997) em ratos com tumor Walker-256. O aumento da arginina plasmática somada à atividade aumentada da arginase no fígado poderia explicar, pelo menos em parte, a elevação da uremia encontrada nos ratos portadores de tumor (figura 6).

A alteração no perfil dos aminoácidos plasmáticos que alcançam o fígado, em ratos portadores de tumor, é possível haja vista a elevada proteólise da síndrome caquética e o intenso consumo de aminoácidos pelas células tumorais. Segundo Medina *et al.* (1990), o consumo de aminoácidos por estas células é muito

superior às suas necessidades metabólicas. Essas células, portanto, são consideradas seqüestradoras de nitrogênio (MEDINA *et al.*, 1992).

Os aminoácidos captados pelas células tumorais que não são utilizados para síntese de proteínas e nucleotídeos (purinas e pirimidinas) podem ser usados na produção de uréia, pois há estudos (REBECA *et al.*, 2006) demonstrando que as células Walker-256, na forma ascítica, são capazes de sintetizar uréia, sendo esta produção maior no 6º do que no 4º dia de desenvolvimento tumoral. Desse modo, considerando a similaridade do perfil de aumento da uréia (figura 6) e das massas tumorais (tabela 1), é possível que a produção aumentada de uréia pelas células Walker-256 tenha contribuído de forma muito importante para elevação da uremia nos animais com câncer.

Da mesma forma do que para os aminoácidos, as células tumorais são também consideradas seqüestradoras de glicose (MEDINA *et al.*, 1992), o que poderia resultar em hipoglicemia do hospedeiro.

Como pode ser observado na figura 7, animais Walker-256 tiveram redução da glicemia desde a fase inicial do desenvolvimento tumoral de forma mais severa que os animais controle *pair fed*, pois apresentaram diferenças com maior nível de significância em relação ao grupo controle a partir do 8º dia, sendo que a glicemia foi menor que o grupo controle *pair fed* no 14º dia após a inoculação das células tumorais.

Apesar da anorexia interferir na glicemia do portador de câncer, outros fatores devem estar envolvidos na severa redução da concentração de glicose plasmática, pelo menos nos estágios mais tardios do desenvolvimento tumoral, como evidenciado pela redução da glicemia no 14º dia de tumor em relação ao grupo controle *pair fed* correspondente (figura 7).

A alta atividade metabólica das células tumorais em um ambiente hipóxico, como já mencionado, implica na utilização da glicólise como principal via para produção de ATP (BRAHIMI-HORN, 2007), o que aumenta grandemente o consumo de glicose, pois para atingir o mesmo saldo energético, o metabolismo anaeróbico necessita de cerca de 40 vezes a quantidade de glicose utilizada sob condições aeróbicas (BONGAERTS *et al.*, 2006). Este aumento do consumo de glicose pelo tumor é apontado como um dos responsáveis pela hipoglicemia característica da síndrome caquética associada ao câncer.

Em humanos saudáveis, a hipoglicemia provoca aumento na produção hepática de glicose, primeiramente pela depleção de glicogênio hepático e depois pela neoglicogênese, para restaurar a concentração de glicose plasmática ao normal (HOLROYDE; REICHARD, 1981). Logo, a diminuição da ingestão alimentar (anorexia) a qual promove por si só diminuição da glicemia (figura 7) pode ser importante na redução do conteúdo de glicogênio no fígado.

De fato, nesta pesquisa, animais controle *pair fed* apresentaram redução de glicogênio hepático no 11º e 14º dias *versus* animais controle (figura 8), provavelmente pela estimulação da glicogenólise, conseqüente à queda da glicemia. Resultados semelhantes foram encontrados para os animais portadores de tumor. Esses dados e a similaridade no conteúdo de glicogênio hepático entre os animais controle *pair fed* e com tumor indicam a anorexia como principal responsável pela redução da concentração de glicogênio hepático. Porém, a anorexia pode não ser o único mecanismo envolvido na depleção do glicogênio, visto que sua concentração foi menor nos ratos portadores de tumor no 5º dia *versus* animais controle e que houve tendência de redução no 5º e 14º dia em comparação aos animais controle *pair fed* correspondentes (figura 8).

Outros mecanismos envolvidos na redução do glicogênio no fígado na caquexia induzida por câncer são: a) capacidade diminuída de captação de glicose exógena e de sua transformação em glicogênio (glicogenogênese), que pode ser decorrente em parte da menor atividade da glicoquinase, enzima específica para fosforilação da glicose no fígado (VICENTINO *et al.*, 2002b), cuja atividade pode estar diminuída em função da resistência hepática à insulina, promovida pela IL-6 (SENN *et al.*, 2003) e b) maior tendência de liberação de glicose das reservas de glicogênio (glicogenólise) (VICENTINO *et al.*, 2002b), que pode ser devida à ação glicogenolítica do LMF (HIRAI *et al.*, 1997).

Em suma, os resultados descritos até aqui demonstram que, na caquexia associada ao tumor Walker-256, há uma série de distúrbios metabólicos, com alterações profundas no perfil lipídico, concentração de precursores neoglicogênicos plasmáticos, uremia, glicemia e conteúdo de glicogênio no fígado. Estas alterações foram se agravando ao longo do processo de desenvolvimento tumoral, sendo muito acentuadas no 14º dia de tumor. Estes resultados acrescentam conhecimento científico, principalmente porque não há outros estudos em que estes

parâmetros metabólicos foram avaliados ao longo do desenvolvimento da caquexia, particularmente a induzida por tumor Walker-256.

Finalmente, nós avaliamos no presente trabalho, em estudos de perfusão de fígado *in situ*, a neoglicogênese hepática e o consumo de oxigênio a partir de vários precursores de glicose (alanina, piruvato, glicerol e lactato), já que não há consenso na literatura se a neoglicogênese está aumentada ou diminuída no câncer.

Há trabalhos demonstrando que no estado portador de tumor há maior liberação de glicose pela neoglicogênese hepática. Pacientes com vários tipos de cânceres apresentaram maior neoglicogênese a partir do lactato, alanina e glicerol (TAYEK *et al.*, 1992; LUNDHOLM *et al. apud* TISDALE, 2000) e o aumento da neoglicogênese foi associado com maior atividade da PEPCK em ratos com tumor (NOGUCHI, 1996). Por outro lado, há estudos de perfusão de fígado que evidenciaram diminuição da neoglicogênese em ratos portadores de tumor Walker-256 quando a alanina foi o precursor neoglicogênico utilizado (CORBELLO-PEREIRA *et al.*, 2004; LIU *et al. apud* KELMER-BRACHT *et al.*, 2006).

O primeiro precursor utilizado aqui para avaliar a neoglicogênese hepática foi a alanina. Como ilustra a figura 15, a alanina captada pelo hepatócito é convertida a piruvato pela enzima desaminadora alanina aminotransferase, que transfere o NH₃ da porção amino da alanina ao α -cetoglutarato formando glutamato. O glutamato, dentro da mitocôndria, libera o íon amônio utilizado na síntese da uréia. O piruvato formado é convertido em glicose, por uma série de reações catalisadas por enzimas, algumas das quais são reguladoras-chave da via como a piruvato carboxilase, PEPCK, frutose 1,6-bifosfatase e glicose 6-fosfatase, ou pode ser convertido a lactato pela lactato desidrogenase (COOMES, 1997; SALWAY, 1994).

Assim, a infusão de alanina no fígado resulta em produção de glicose, piruvato, lactato e uréia (figuras 9 e 10). Parte da glicose formada é utilizada como fonte de energia para o fígado, visto que a própria via neoglicogênica necessita de ATP, através de metabolismo aeróbico, com aumento do consumo de oxigênio, o acceptor final de elétrons.

Desse modo, a infusão hepática de qualquer precursor neoglicogênico aumenta, além da produção de glicose, o consumo de oxigênio, como ilustrado nas figuras 9, 11, 12, 13 e 14. Observa-se também, nestas figuras, que os valores basais do consumo de oxigênio hepático (0 a 10 minutos de

perfusão) foram menores (figuras 12C, 13C e 14C) ou tenderam a ser menores (figuras 9C e 11C) nos animais com tumor Walker-256, provavelmente devido à menor oxidação de ácidos graxos livres face à redução das atividades das CATs, como observado nos estudos de Vicentino *et al.* (2002a).

Entretanto, a infusão de alanina nos fígados dos animais no 12º dia de desenvolvimento de tumor Walker-256 resultou em menor produção de glicose, uréia e piruvato, em tendência de redução da produção de lactato e em menor consumo de oxigênio em relação aos animais controles, não portadores de câncer (figuras 9 e 10). A inibição da neoglicogênese foi de aproximadamente 60% (figura 15).

A redução da produção hepática de uréia e piruvato a partir da alanina sugere que a enzima que converte a alanina a piruvato, a alanina aminotransferase, esteja inibida nos animais portadores de tumor, conforme demonstrado por Herzfeld & Greengard (CORBELLO-PEREIRA *et al.*, 2004).

Em concordância, Corbello-Pereira *et al.* (2004) encontraram redução da neoglicogênese e no consumo de oxigênio hepáticos em animais portadores de tumor Walker-256 quando os precursores foram a alanina e alanina + aspartato, redução somente da neoglicogênese pela infusão de alanina + ornitina, mas não houve alteração da neoglicogênese estimulada pelos precursores lactato + amônia, piruvato + amônia, aspartato + amônia, aspartato, arginina, citrulina, aspartato + citrulina, glutamina e glutamina + aspartato.

Adicionalmente, quando o precursor neoglicogênico infundido no fígado foi o piruvato, houve redução da neoglicogênese e do consumo de oxigênio no grupo tumor, respectivamente, em 33% e 27%. Quando o precursor foi o lactato também houve inibição de 26% e 40%, respectivamente, para neoglicogênese e consumo de oxigênio no grupo tumor (figuras 11 e 12).

O menor grau de redução da neoglicogênese pelo piruvato e lactato (\cong 30%) em relação ao encontrado pela alanina (\cong 60%) reforça os achados anteriores de inibição da alanina aminotransferase nos animais portadores de tumor, como pode ser deduzido a partir da análise da figura 15.

Como as porcentagens de inibição pelo piruvato e pelo lactato na neoglicogênese foram próximas, inclusive a do lactato um pouco menor, pode-se inferir (figura 15) que a atividade da lactato desidrogenase hepática não esteja alterada em portadores de tumor Walker-256. Enzimas que poderiam estar inibidas

nestes animais são a frutose 1,6-bifosfatase, glicose 6-fosfatase, piruvato carboxilase e PEPCK.

Entretanto, a ausência de inibição da neoglicogênese a partir do glicerol nos animais portadores de tumor (figura 14) descarta a possibilidade de inibição da frutose 1,6-bifosfatase e da glicose 6-fosfatase, enzimas regulatórias que catalisam reações posteriores à entrada do glicerol.

Em conjunto, os resultados anteriores sugerem inibição da alanina aminotransferase, piruvato carboxilase e/ou da PEPCK nos animais portadores de tumor, mas não excluem a possibilidade, também, de redução da captação hepática dos precursores de glicose.

A procura dos agentes que causam mudanças na neoglicogênese hepática tem sido concentrada nas citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e interleucinas, em pacientes e animais com câncer, sepse e artrite crônica (KERLMER-BRACHT *et al.*, 2006). O TNF- α em baixas doses (18 μ g/Kg) diminuiu a expressão da PEPCK em camundongos (Hill & McCallum *apud* KELMER-BRACHT *et al.*, 2006), este efeito pode estar relacionado com a redução da neoglicogênese hepática pelo substrato alanina. Kelmer-Bracht *et al.* (2006) demonstraram que a administração de baixas doses de TNF- α e IL-1 β , isoladamente (10 μ g/Kg) ou simultaneamente (5 μ g/Kg de cada citocina), inibiu a neoglicogênese hepática a partir da alanina em ratos. Porém, Blumberg *et al.* (1995) observaram que altas doses de TNF- α (150 μ g/Kg) são capazes de aumentar a neoglicogênese, da alanina, *in vivo*. Estes dados permitem inferir que o tipo de efeito das citocinas na neoglicogênese, estimulatório ou inibitório, pode ser dependente da sua concentração circulante e do tipo de citocinas, que poderiam sofrer alterações em função do perfil de resposta imune, o qual varia de acordo com o estágio de desenvolvimento do tumor, com o tamanho da massa tumoral, com o tipo de tumor, entre outros. Isto poderia explicar, pelo menos em parte, a discordância entre os resultados da literatura.

Em todas as perfusões *in situ* realizadas anteriormente foram utilizadas concentrações de precursores neoglicogênicos definidas como saturantes, vale ressaltar, saturantes para animais saudáveis. Porém, a capacidade do fígado para responder a um substrato neoglicogênico *in vivo* depende da sua concentração

plasmática e também da concentração de fatores regulatórios (CORBELLO-PEREIRA *et al.*, 2004).

Com base nisto, perfusões de fígado em animais no 12º dia de desenvolvimento do tumor foram conduzidas para análise da neoglicogênese estimulada pela infusão de lactato 8 mM (figura 13), uma concentração próxima àquela observada no plasma (7,75 mM) de animais no 11º dia de tumor (figura 5), isto é, uma concentração de lactato acima da saturante (2 mM) para animais sem tumor.

As produções de glicose nos grupos controles das perfusões com lactato 2 mM e 8 mM foram as mesmas, confirmando que a concentração 2 mM já é saturante aos animais sadios (figuras 12 e 13). Em contrapartida, a neoglicogênese e o consumo de oxigênio do grupo tumor foram semelhantes ao controle quando infundido o lactato 8 mM, como se a via e a respiração aeróbica fossem restauradas pela maior concentração do substrato.

Isto indica uma alteração da concentração saturante de lactato para produção de glicose em fígados de animais portadores de tumor Walker-256, mas não se pode afirmar se a concentração saturante é maior ou menor que 8 mM.

É possível que a elevação do lactato plasmático para valores superiores a 2 mM, concentração encontrada em ratos normais, seja importante para impedir uma queda ainda mais acentuada da glicemia no 14º dia de tumor, visto que a neoglicogênese mostrou-se inibida para 2 mM e não para 8 mM.

Igualmente, o glicerol deve ter um papel relevante no impedimento de uma hipoglicemia mais grave, diante da inibição da neoglicogênese a partir dos outros precursores. Assim, estes dois precursores de glicose devem contribuir significativamente para manutenção da homeostase glicêmica, a qual é importante não só como fonte energética para o tumor, mas principalmente para manutenção da vida do hospedeiro portador do câncer.

A utilização do glicerol como precursor de glicose nos animais Walker-256 pode também explicar a manutenção das concentrações plasmáticas deste substrato a valores encontrados em animais sadios controle e controle *pair fed*, apesar do aumento de ácidos graxos livres plasmáticos provindos da lipólise no tecido adiposo.

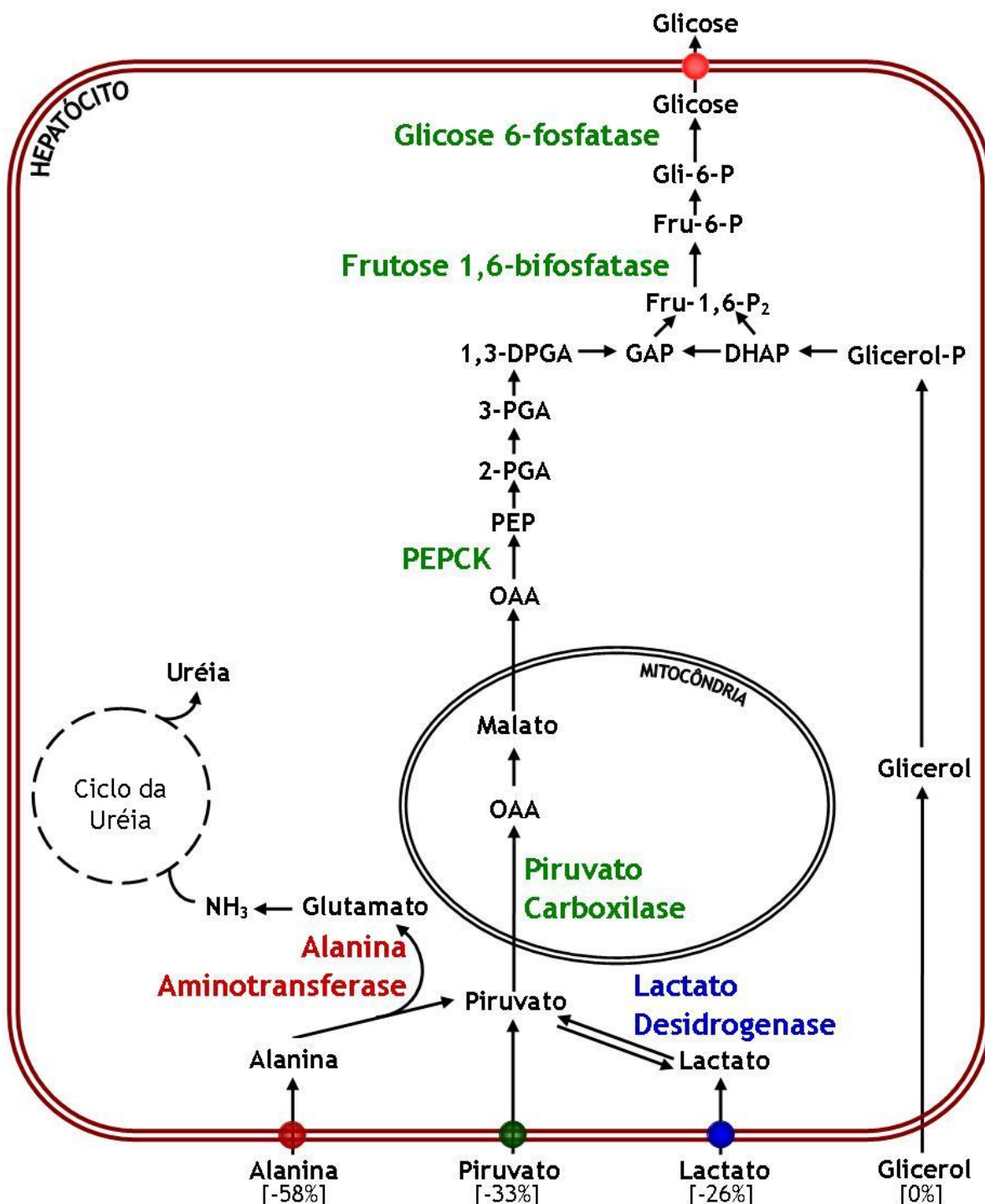


Figura 15 – Neoglicogênese pelos precursores alanina, piruvato, lactato e glicerol, e as principais enzimas que regulam a via. OAA, oxalacetato; Mal, malato; PEP, fosfoenolpiruvato; 2-PGA, 2-fosfoglicerato; 3-PGA, 3-fosfoglicerato; 1,3-DPGA, 1,3-difosfoglicerato; GAP, gliceraldeído 3-fosfato; DHAP, dihidroxiacetona fosfato; Glicerol-P, glicerol fosfato; Fru-1,6- P_2 , frutose 1,6-bifosfato; Fru-6-P, frutose 6-fosfato; Gli-6-P, glicose 6-fosfato; PEPCK, fosfoenolpiruvato carboxiquinase. [], % inibição da neoglicogênese.

A inibição da neoglicogênese a partir da alanina, um precursor neoglicogênico importante, e também do piruvato, corroboram com a hipoglicemia aos 14 dias após a inoculação das células Walker-256. Então, a acentuada redução da glicemia neste dia, queda de 56% versus animais controle e de 41% em comparação aos controle pair fed (figura 7), pode ser resultante não apenas do aumento do consumo de glicose pelo tumor, face ao aumento da massa tumoral que praticamente dobrou no 14o dia em relação ao 11o (tabela 1), mas também da inibição da neoglicogênese destes precursores, que no 14o dia pode estar ainda mais acentuada.

No entanto, isto é apenas uma possibilidade. Vale refletir que os nossos estudos para avaliação da neoglicogênese foram realizados em perfusão de fígado *in situ*, uma técnica onde o fígado é isolado da circulação. É possível, que *in vivo* o fígado sofra a influência de fatores circulatórios, alterados no estado portador do tumor, como os ácidos graxos. Um aumento nos ácidos graxos plasmáticos e conseqüentemente na sua oxidação hepática poderia estimular a neoglicogênese (MLINAR *et al.*, 2007) pela maior geração de acetil-CoA, a qual ativa a piruvato carboxilase e PEPCK, e também pela maior geração de NADH e ATP, que são usados na neoglicogênese. Isto poderia explicar, pelo menos em parte, o aumento da liberação hepática de glicose encontrada em alguns indivíduos com câncer (TAYEK, 1992).

Se de fato *in vivo* os ácidos graxos estimulam a neoglicogênese no estado portador do tumor, a hipoglicemia observada no 14^o dia de tumor (figura 7) seria decorrente principalmente do aumento da massa tumoral. Contudo, mais estudos são necessários para esclarecer esta questão.

Este trabalho buscou mostrar as alterações metabólicas ao longo do desenvolvimento da caquexia, um passo importante para estudos futuros no sentido de entender a complexidade da caquexia do câncer e traçar possíveis medidas de tratamento mais eficazes que as atuais, levando-se em consideração o estágio da doença.

Conclusões

6 CONCLUSÕES

- O tumor Walker-256, implantado subcutaneamente em ratos, apresenta crescimento rápido com alto poder de realizar metástases e é capaz de induzir, no hospedeiro, o desenvolvimento da caquexia tão logo ao seu implante, com aproximadamente 10% de perda de peso já no 5º dia após a inoculação das células tumorais.
- A caquexia induzida pelo tumor Walker-256 provocou redução de massa magra e anorexia a partir do 11º dia do desenvolvimento tumoral, mas alterações no metabolismo de carboidratos e no perfil lipídico foram observadas em estágios mais precoces.
- Os primeiros parâmetros alterados nos animais portadores de tumor foram a glicemia e o conteúdo de glicogênio hepático, os quais reduziram progressivamente ao longo do período de desenvolvimento do tumor.
- No 8º dia de desenvolvimento tumoral houve aumento de lactato e triacilgliceróis plasmáticos, enquanto que os controles *pair fed* correspondentes tiveram, respectivamente, nenhuma alteração e redução destes compostos. Apesar da aparente redução, o conteúdo de glicogênio hepático não apresentou diferença significativa neste dia.
- No 11º dia após a inoculação das células tumorais as alterações foram muito mais proeminentes, com hipoglicemia, maior redução do glicogênio hepático, maior concentração de lactato plasmático, hipertrigliceridemia e tendência de redução no colesterol plasmático. Ao comparar os resultados com o grupo controle *pair fed*, a contribuição da anorexia parece estar presente apenas na diminuição da glicemia e do glicogênio hepático.
- No 14º dia do desenvolvimento do tumor Walker-256, a perda de peso atingiu cerca de 26%, conferindo uma caquexia bastante avançada neste estágio do curso da doença. A hipoglicemia tornou-se mais severa e diferente em relação ao controle *pair fed*, o conteúdo de glicogênio hepático foi equivalente a 8% do

conteúdo de animais controles, o lactato plasmático apresentou um aumento exacerbado de 282%, a hipertrigliceridemia e a tendência de redução do colesterol plasmático foram mantidas aos níveis encontrados no 11º dia e, somado a essas mudanças, houve aumento na concentração plasmática dos ácidos graxos livres.

- Os estudos de perfusão de fígado *in situ* em animais, no 12º dia de desenvolvimento tumoral, mostraram diferentes graus de inibição da neoglicogênese e do consumo de oxigênio, de acordo com o precursor utilizado (alanina > piruvato = lactato 2 mM), ou nenhuma alteração (lactato 8 mM e glicerol) nestes parâmetros.
- A diminuição da neoglicogênese hepática pode ter sido resultante da inibição da alanina aminotransferase, piruvato carboxilase e/ou da PEPCK. As atividades da lactato desidrogenase, frutose 1,6-bifosfatase e glicose 6-fosfatase provavelmente não foram alteradas nos animais portadores de câncer.

Em suma, pode-se concluir que os animais portadores de tumor Walker-256 apresentaram sinais característicos da caquexia, como emagrecimento, catabolismo muscular e anorexia, e também muitas alterações metabólicas de parâmetros plasmáticos e hepáticos, algumas das quais se iniciaram já no 5º dia após a inoculação das células tumorais, e acentuaram-se no decorrer do desenvolvimento do processo caquético. Tais alterações não foram resultado da menor ingestão alimentar, pois elas não foram encontradas nos animais controle *pair fed*. É provável que fatores produzidos pelo tumor ou pelo hospedeiro (citocinas) em resposta à presença do tumor sejam os mediadores dessas alterações e, também, das observadas na neoglicogênese hepática.

Referências

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K. ; LICHTMAN, A. H. **Imunologia Celular e Molecular**. 5ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda, 2005.

ACHARYYA, S.; LADNER, K. J.; NELSEN, L.; DAMRAUER, J.; REISER, P. J.; SWOAP, S.; GUTTRIDGE, D. C. Cancer cachexia is regulated by selective targeting of skeletal muscle gene products. **J. Clin. Invest.**, 114(3): 370-8, 2004.

ARGILÉS, J. M.; BUSQUETS, S.; LÓPEZ-SORIANO, F. J. Cytokines in the pathogenesis of cancer cachexia. **Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.**, 6(4): 401-6, 2003.

ARGILÉS, J. M.; BUSQUETS, S.; GARCÍA-MARTÍNEZ, C.; LÓPEZ-SORIANO, F.J. Mediators involved in the cancer anorexia-cachexia syndrome: past, present, and future. **Nutrition.**, 21: 977-85, 2005.

ARIAS, J-I.; ALLER, M-A.; ARIAS, J. Cancer cell: using inflammation to invade the host. **Mol. Cancer.**, 6: 29-40, 2007.

ARNER, P. Differences in lipolysis between human subcutaneous and omental adipose tissues. **Ann. Med.**, 27(7): 435-8, 1995.

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.**, 6: 425-32, 1994.

BERGMEYER, H. U.; BERNT, E. **Determination of glucose with glucose-oxidase and peroxidase**. In: Bergmeyer H. U. (Editor), *Methods of Enzymatic Analysis*, Vol. 2. Academic Press, New York, 1205-1215, 1974.

BERTEVELLO, P. S.; SEELAENDER, M. C. L. Heterogeneous response of adipose tissue to cancer cachexia. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 34: 1161-7, 2001.

BLAAUW, I.; NICOLAAS, E. P. D.; WILLEM, B.; MEYENFELDT, M. F. Hepatic amino acid and protein metabolism in non-anorectic moderately cachectic tumour-bearing rats. **J. Hepatol.**, 26: 396-408, 1997.

BLUMBERG, D.; HOCHWALD, S.; BURT, M.; DONNER, D.; BRENNAN, M. F. Tumor necrosis factor alpha stimulates gluconeogenesis from alanine *in vivo*. **J. Surg. Oncol.**, 59: 220-4, 1995.

BODEN, G.; SHE, P.; MOZZOLI, M.; CHEUNG, P.; GUMIREDDY, K.; REDDY, P.; XIANG, X.; LUO, Z.; RUDERMAN, N. Free fatty acids produce insulin resistance and activate the proinflammatory nuclear factor- κ B pathway in rat liver. **Diabetes.**, 54: 3458-65, 2005.

BONGAERTS, G. P. A.; VAN-HALTEREN, H. K.; VERHAGEN, C. A. M.; WAGENER, D. J. Th. Cancer cachexia demonstrates the energetic impact of gluconeogenesis in human metabolism. **Med. Hypotheses.**, 67: 1213-22, 2006.

BOYD, D. B. Insulin and cancer. **Integr. Cancer. Ther.**, 2: 315-29, 2003.

BRAHIMI-HORN, M. C.; CHICHE, J.; POUYSSÉGUR, J. Hypoxia signalling controls metabolic demand. **Curr. Opin. Cell Biol.**, 19: 223-9, 2007.

BULLÓ-BONET, M.; GARCÍA-LORDA, P.; LÓPEZ-SORIANO, F. J.; ARGILÉS, J. M.; SALAS-SALVADÓ, J. Tumour necrosis factor, a key role in obesity? **FEBS Lett.**, 451: 215-9, 1999.

CASPER, R. C. Carbohydrate metabolism and its regulatory hormones in anorexia nervosa. **Psychiatry Res.**, 62: 85-96, 1996.

COOMES, M. W. Amino acid metabolism. In: DEVLIN, T. M. **Textbook of Biochemistry with clinical correlations**. 4th ed. New York: Wiley-Liss, 1997. p. 445-88.

CORBELO-PEREIRA, S. R.; DARRONQUI, E.; CONSTANTIN, J.; SILVA, M. H. R. A.; YAMAMOTO, N. S.; BRACHT, A. The urea cycle and related pathways in the liver of Walker-256 tumor-bearing rats. **Biochim. Biophys. Acta.**, 1688: 187-96, 2004.

COSTELI, P.; BACCINO, F. M. Mechanisms of skeletal muscle depletion in wasting syndromes: role of ATP-ubiquitin-dependent proteolysis. **Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.**, 6: 407-12, 2003.

CURI, R.; POMPÉIA, C.; MIYASAKA, C. K.; PROCÓPIO, J. **Entendendo a gordura: os ácidos graxos**. São Paulo, Manole, 2002.

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

DELARUE, J.; MAGNAN, C. Free fatty acids and insulin resistance. **Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.**, 10: 142-8, 2007.

DOWNWARD, J. Mechanism and consequences of activation of protein kinase B/Akt. **Curr. Opin. Cell Biol.**, 10: 262-7, 1998.

ELSASSER-BEILE, U.; WEBER, W.; WILD, E. D.; SCHULTE MONTING, J.; von KLEIST, S. Increased plasma concentrations for type I and II tumor necrosis factor receptors and IL-2 receptors in cancer patients. **Tumour Biol.**, 15(1): 17-24, 1994.

FALHOLT, K.; LUND, B.; FALHOLT, W. An easy colorimetric micrometod for routine determination of free fatty acids in plasma. **Clin. Chem. Acta.**, 46: 105-111, 1973.

FEARON, K. C. H. The mechanisms and treatment of weight loss in cancer. **Proc. Nutr. Soc.**, 51: 251-60, 1992.

FERNANDES, L. C.; MACHADO, U. F.; NOGUEIRA, C. R.; CARPINELLI, A. R.; CURI, R. Insulin secretion in Walker 256 tumor cachexia. **Am. J. Phys.**, 258: E1033-6, 1990.

FRIED, S. K.; ZECHNER, R. Cachectin/tumor necrosis factor decreases human adipose tissue lipoprotein lipase mRNA levels, synthesis, and activity. **J. Lipid. Res.**, 30: 1917-23, 1989.

GOLL, D. E.; THOMPSON, V. F.; TAYLOR, R. G.; CHRISTIANSES, J. A. Role of the calpain system in muscle growth. **Biochimie.**, 74(3): 225-37, 1992.

GROFF, J. L.; GROPPER, S. S.; HUNT, S. M. **Advanced nutrition and human metabolism**. New York: West Publishing Company, 1995.

GUAITANI, A.; RECCHIA, M.; CARLI, M.; ROCHETTI, M.; BARTOSEK, I.; GARATTINI, S. Walker carcinoma 256: a model for studies on tumor-induced anorexia and cachexia. **Oncology.**, 39: 173-8, 1982.

GUTMANN, I.; BERGMAYER, H. U. **Determination of urea, indicator reaction with phenol and hypochlorite**. In: BERGMAYER, H. U. *Methods of Enzymatic Analysis*. New York: Academic Press, 1974. p. 1790-8.

GUTMANN, I.; WAHLEFELD, W. L-(+)-Lactate. **Determination with lactate dehydrogenase and NAD**. In: Bergmeyer H. U. (Editor), *Methods of Enzymatic Analysis*, Vol. 2. New York: Academic Press, 1974. p. 1464-72.

HASSID, W. Z.; ABRAHAM, S. **Chemical procedures for analysis of polysaccharides**. In: S.P. COLOWICK, N.D., KAPLAN (eds). *Methods in enzymology*. v.3. New York, Academic Press, 1957, p. 34-51.

HIRAI, K.; ISHIKO, O.; TISDALE, M. Mechanism of depletion of liver glycogen in cancer cachexia. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 241: 49-52, 1997.

HOLROYDE, C. P.; REICHARD, G. A. Carbohydrate metabolism in cancer cachexia. **Cancer. Treat. Rep.**, 65(5): 55-9, 1981.

HOTAMISLIGIL, G. S. The role of TNF α and TNF receptors in obesity and insulin resistance. **J. Intern. Med.**, 245: 621-5, 1999.

INUI, Akio. Cancer anorexia-cachexia syndrome: Are neuropeptides the key? **Cancer. Res.**, 59: 4493-501, 1999.

INUI, A.; MEGUID, M. M. Cachexia and obesity: two sides of one coin? **Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.**, 6(4): 395-9, 2003.

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

KELMER-BRACHT, A. M.; BROETTO-BIAZON, A. C.; SÁ-NAKANISHI, A. B; ISHII-IWAMOTO, E. L.; BRACHT, A. Low doses of tumour necrosis factor α and interleukin 1 β diminish hepatic gluconeogenesis from alanine *in vivo*. **Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.**, 99: 335-9, 2006.

KELMER-BRACHT, A. M.; ISHII, E. L.; ANDRADE, P. V. M.; BRACHT, A. Construção de aparelho de perfusão de fígado para estudos de regulação do metabolismo e de mecanismos de ação de drogas. **Arq. Biol. Tecnol.**, 27(4): 419-438, 1984.

KOTLER, D. P. Cachexia. **Ann. Intern. Med.**, 133(8): 622-34, 2000.

LANGSTEIN H. N.; NORTON, J. A. Mechanisms of cancer cachexia. **Hematol. Oncol. Clin. North Am.**, 5(1): 103-23, 1991.

LECKER, S. H.; SOLOMON, V.; MITCH, W. E.; GOLDBERG, A. L. Muscle protein breakdown and critical role of the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. **J. Nutr.**, 129: 227-37, 1999.

LOBERG, R. D.; BRADLEY, D. A.; TOMLINS, S. A.; CHINNAIYAN, A. M.; PIENTA, K. J. The lethal phenotype of cancer: the molecular basis of death due to malignancy. **CA Cancer. J. Clin.**, 57: 225-241, 2007.

MacDOUGALD, O. A.; MANDRUP, S. Adipogenesis: forces that tip the scales. **Trends Endocrinol. Metab.**, 13: 5-11, 2002.

McGARRY, J. D. Lipid Metabolism I: utilization and storage of energy in lipid form. In: DEVLIN, T. M. **Textbook of Biochemistry with clinical correlations**. 4th ed. New York: Wiley-Liss, 1997. p. 361-91.

MARTIGNONI, M. E.; KUNZE, P.; FRIESS, H. Câncer cachexia. **Mol. Cancer.**, 2(36): 1-3, 2003.

MAZUREK, S.; BOSCHEK, C. B.; EIGENBRODT, E. The role of phosphometabolites in cell proliferation, energy metabolism, and tumor therapy. **J. Bioenerg. Biomembr.**, 29(4): 315-30, 1997.

MEDINA, M. A. Glutamine and cancer. **J. Nutr.**, 131(9): 2539S-42S, 2001.

MEDINA, M. A.; CASTRO, I. N. Glutaminolysis and glycolysis interactions in proliferant cells. **Int. J. Biochem.**, 22(7): 681-3, 1990.

MEDINA, M. A.; SANCHEZ-JIMENEZ, F.; MARQUEZ, J.; QUESADA, A. R.; CASTRO, I. N. Relevance of glutamine metabolism to tumor cell growth. **Mol. Cell. Biochem.**, 113(1): 1-15, 1992.

MENENDEZ, J. A.; LUPU, R. Oncogenic properties of the endogenous fatty acid metabolism: molecular pathology of fatty acid synthase in cancer cells. **Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.**, 9: 346-57, 2006.

METER, U.; GRESSNER, A. M. Endocrine regulation of energy metabolism: review of pathobiochemical and clinical chemical aspects of leptin, ghrelin, adiponectin, and resistin. **Clin. Chem.**, 50(9): 1511-25, 2004.

MLINAR, B.; MARC, J.; JANEŽ, A.; PFEIFER, M. Molecular mechanisms of insulin resistance and associated diseases. **Clin. Chim. Acta.**, 375: 20-35, 2007.

MORAES, M. O.; FONTELES, M. C.; MORAES, M. E. A.; MACHADO, M. I. L.; MATOS, F. J. A. Screening for Anticancer Activity of Plants from the Northeast of Brazil. **Fitoterapia** 68(3): 235-40, 1997.

MORIN, C. L.; SCHLAEPFER, I. R.; ECKEL, R. H. Tumor necrosis factor- α eliminates binding of NF- κ B and an octamer-binding protein to the lipoprotein lipase promoter in 3T3-L1 adipocytes. **J. Clin. Invest.**, 95: 1684-9, 1994.

MORLEY, J. E.; THOMAS, D. R.; WILSON, M-M. G. Cachexia: pathophysiology and clinical relevance. **Am. J. Clin. Nutr.**, 83: 735-43, 2006.

MULLIGAN, H. D.; BECK, S. A.; TISDALE, M. J. Lipid metabolism in cancer cachexia. **Br. J. Cancer.**, 66: 57-61, 1992.

MUND, R. C.; PIZATO, N.; BONATTO, S.; NUNES, E. A.; VICENZI, T.; TANHOFFER, R.; OLIVEIRA, H. H. P.; CURI, R.; CALDER, P. C.; FERNANDES, L. C. Decreased tumor growth in Walker 256 tumor-bearing rats chronically supplemented with fish oil involves COX-2 and PGE2 reduction associated with apoptosis and increased peroxidation. **Prostaglandins leukot. essent. fatty acids.**, 76: 113-20, 2007.

NAVARRO, R.; GAVINA, F.; SANCHEZ, J. Some alterations in the amount of blood aminoacids in the Wistar rats inoculated with the 256 Walker carcinoma. **Rev. Esp. Fisiol.**, 22(3): 135-40, 1966.

NETO, J. C. B.; FRANZI, S. A.; CARVALHO, M. B.; GUEDES, A. L. Fisiopatologia e tratamento da caquexia neoplásica. **Revi. Soc. Bras. Cancerol.**, 15: 26-35, 2001.

NOGUCHI, Y.; NOMURA, K.; YASHIKAWA, T.; FUZUKAWA, K.; MAKINO, T.; TSUBARAYA, A.; MATSUMOTO, A. Role of insulin resistance in decreasing lipoprotein lipase activity in tumor-bearing rats. **Surg. Today.**, 26(4): 271-5, 1996.

OLIVEIRA, P. F. M.; HENRIQUES, I. A.; FILHO, R. F.; ALMEIDA, P. R. C.; MORAES, M. O. Estabelecimento de um modelo de tumor experimental pela inoculação do tumor de walker em estômago de rato. **Acta Cir. Bras.** 13(4): 243-248, 1998.

PAPE, M. E.; KIM, K. H. Effect of tumor necrosis factor on acetyl-coenzyme A carboxylase gene expression and preadipocyte differentiation. **Mol. Endocrinol.**, 2(5): 395-403, 1988.

PATIAG, D.; GRAY, S.; IDRIS, I.; DONNELLY, R. Effects of tumor necrosis factor- α and inhibition of protein kinase C on glucose uptake in L6 myoblasts. **Clin. Sci.**, 99: 303-7, 2000.

PEKALA, P. H.; KAWAKAMI, M.; ANGUS, C. W.; LANE, M. D.; CERAMI, A. Selective inhibition of synthesis of enzymes for de novo fatty acid biosynthesis by an endotoxin-induced mediator from exudate cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, 80: 2743-7, 1983.

PIFFAR, P. M.; FERNANDEZ, R.; TCHAIKOVSKI Jr., O.; HIRABARA, S. M.; FOLADOR, A.; PINTO, G. J.; JAKOBI, S.; GOBBO-BORDON, D.; ROHN, T. V.; FABRÍCIO, V. E. B.; MORETTO, K. D.; TOSTA, E.; CURI, R.; FERNANDES, L. C. Naproxen, clenbuterol and insulin administration ameliorates cancer cachexia and reduce tumor growth in Walker 256 tumor-bearing rats. **Cancer. Lett.**, 201: 139-48, 2003.

PIZATO, N.; BONATTO, S.; YAMAZAKI, R. K.; AIKAWA, J.; NOGATA, C.; MUND, R. C.; NUNES, E. A.; PICONCELLI, M.; NALIWAIKO, K.; CURI, R.; CALDER, P. C.; FERNANDES, L. C. Ratio of n6 to n-3 fatty acids in the diet affects tumor growth and cachexia in Walker 256 tumor-bearing rats. **Nutr. Cancer.**, 53(2): 194-201, 2005.

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

PLOMGAARD, P.; BOUZAKRI, K.; KROGH-MADSEN, R.; MITTENDERFER, B.; ZIERATH, J. R.; PEDERSEN, B. K. Tumor necrosis factor- α induces skeletal muscle insulin resistance in healthy human subjects via inhibition of Akt substrate 160 phosphorylation. **Diabetes.**, 54: 2939-45, 2005.

PRINS J. B.; NIESLER, C. U.; WINTERFORD, C. M.; BRIGHT, N. A.; SIDDLE, K.; O'RAHILLY, S.; WALKER, N. I.; CAMERON, D. P. Tumor necrosis factor-alpha induces apoptosis of human adipose cells. **Diabetes.**, 46: 1939-44, 1997.

RAMOS, E. J. B.; SUZUKI, S.; MARKS, D.; INUI, A.; ASAKAWA, A.; MEGUID, M. M. Cancer anorexia-cachexia syndrome: cytokines and neuropeptides. **Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.**, 7: 427-34, 2004.

RANDLE, P. J.; HALES, C. N.; GARLAND, P. B.; NEWSHOLME, E. A. The glucose fatty-acid cycle its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. **Lancet.**, 785-89, 1963.

REBECA, R.; BRACHT, L.; NOLETO, G. R.; ROCHA, M. E. M.; OLIVEIRA, M. B. M. L-Glutamine and L-Arginine utilization by Walker 256 cells. In: XXXV Reunião Anual SBBq, 2006, Águas de Lindóia. **Anal Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular**, 2006.

ROFE, A. M.; BOURGEOIS, C. S.; COYLE, P.; TAYLOR, A.; ABDI, E. A. Altered insulin response to glucose in weight-losing cancer patients. **Anticancer Res.**, 14(2B): 647-50, 1994.

RUBIN, H. Cancer Cachexia: its correlations and causes. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 100: 5384-9, 2003.

SAINI, A.; NASSER, A-S.; STEWART, C. E. H. Waste management – cytokines, growth factors and cachexia. **Cytokine Growth Factor Rev.**, 17: 475-86, 2006.

SALWAY, J. G. **Metabolism at a Glance**. London: Blackwell Science Ltd, 1994. p.52-71.

SEELAENDER, M. C.; CURI, R.; COLQUHOUN, A.; WILLIAMS, J. F.; ZAMMIT, V. A. Carnitine palmitoyltransferase II activity is decreased in liver mitochondria of cachectic rats bearing the Walker 256 carcinosarcoma: effect of indomethacin treatment. **Biochem. Mol. Biol. Intern.**, 44(1): 185-93, 1998.

SENN, J. J.; KLOVER, P. J.; NOWAK, I. A.; ZIMMERS, T. A.; KONIARIS, L. G.; FURLANETTO, R. W.; MOONEY, R. A. Suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3), a potential mediator of interleukin-6-dependent insulin resistance in hepatocytes. **J. Biol. Chem.**, 278(16): 13740-6, 2003.

SHAW, R. J. Glucose metabolism and cancer. **Curr. Opin. Cell Biol.**, 18: 598-608, 2006.

SOUZA, H. M. **Resposta glicogenolítica e responsividade hepática a substratos neoglicogênicos durante hipoglicemia induzida por insulina.** 1999. 156 p. Tese – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

TAYEK, J. A. A review of cancer cachexia and abnormal glucose metabolism in humans with cancer. **J. Am. College Nutr.**, 11: 445–56, 1992.

TIETZ, N. W. **Clinical Guide to Laboratory Tests.** 4th. Saunders, 1995.

TIJERINA, A. J. The biochemical basis of metabolism in cancer cachexia. **Dimens. Crit. Care Nurs.**, 23(6): 237-43, 2004.

TISDALE, M. J. Biology of cachexia. **J. Natl. Cancer. Inst.**, 89(23): 1762-73, 1997.

TISDALE, M. J. Wasting in cancer. **Am. Soc. Nutr. Sci.**, 129: 213S-6S, 1999

TISDALE, M. J. Metabolic abnormalities in cachexia and anorexia. **Nutr.**, 16(10): 1013-4, 2000.

TISDALE, M. J.; Cachexia in cancer patients. **Nat. Rev. Cancer.**, 2: 862-71, 2002.

TISDALE, M. J. Pathogenesis of cancer cachexia. **J. Support. Oncol.**, 1: 159-68, 2003.

TISDALE, M. J. Tumor-host interactions. **J. Cell. Biochem.**, 93(5): 871-7, 2004.

TISDALE, M. J. Molecular pathways leading to cancer cachexia. **Physiology.**, 20: 340-8, 2005.

TISDALE, M. J.; BECK, S. A. Inhibition of tumour-induced lipolysis in vitro and cachexia and tumour growth in vivo by eicosapentaenoic acid. **Biochem. Pharmacol.**, 41(1): 103-7, 1991.

TODOROV, P. T.; DEACON, P. T.; TISDALE, M. J. Structural analysis of a tumor-produced sulfated glycoprotein capable of initiating muscle protein degradation. **J. Biol. Chem.**, 272(19): 12279-88, 1997.

TORISU, T.; SATO, N.; YOSHIGA, D.; KOBAYASHI, T.; YOSHIOKA, T.; MORI, H.; IIDA, M.; YOSHIMURA, A. The dual function of hepatic SOCS3 in insulin resistance *in vivo*. **Genes Cells.**, 12: 143-54, 2007.

TORTI, F. M.; DIECKMANN, B.; BEUTLER, B.; CERAMI, A.; RINGOLD, G. M. A macrophage factor inhibits adipocyte gene expression: an *in vitro* model of cachexia. **Sciences.**, 229 (4716): 867-9, 1985.

TRINDER, P. Determination of blood-glucose using an oxidase-peroxidase system with a non-carcinogenic chromogen. **Annals of Clinical Biochemistry** 6: 24, 1969.

UCHIDA, T.; TSUKAHARA, F.; OHBA, K.; OGAWA, A.; IRIE, K.; FUJII, E.; YOSHIMOTO, T.; YOSHIOKA, T.; MURAKI, T. Nitric oxide mediates down regulation of lipoprotein lipase activity induced by tumor necrosis factor- α in brown adipocytes. **Eur. J. Pharmacol.**, 335(2-3): 235-43, 1997.

VAN HALL, G.; STEENSBERG, A.; SACCHETTI, M.; FISCHER, C.; KELLER, C.; SCHJERLING, P. Interleukin-6 stimulates lipolysis and fat oxidation in humans. **J Clin. Endocrinol. Metab.**, 88(7): 3005-10, 2003.

VICENTINO, C.; CONSTANTIN, J.; BRACHT, A.; YAMAMOTO, N. S. Long-chain fatty acid uptake and oxidation in the perfused liver of Walker-256 tumour-bearing rats. **Liver.**, 22: 342-50, 2002a.

VICENTINO, C.; CONSTANTIN, J.; STECANELLA, L. A.; BRACHT, A.; YAMAMOTO, N. S. Glucose and glycogen catabolism in perfused livers of Walker-256 tumor-bearing rats and the response to hormones. **Pathophysiology.**, 8: 175-82, 2002b.

WARNE, J. P. Tumor necrosis factor α : a key regulator of adipose tissue mass. **J. Endocrinol.**, 177: 351-5, 2003.

YOSHIKAWA, T.; NOGUCHI, Y.; SATOH, S. Inhibition of IRS-1 phosphorylation and the alterations of GLUT4 in isolated adipocytes from cachectic tumor-bearing rats. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 256: 678-81, 1999.

YOSHIKAWA, T.; NOGUCHI, Y.; SATOH, S.; DOI, C.; OKAMOTO, T.; NOMURA, K.; MAKINO, T.; TSUBURAYA, A.; MATSUMOTO, A. Insulin resistance and the alterations of glucose transporter-4 in adipose cells from cachectic tumor-bearing rats. **J. Parenter. Enteral Nutr.**, 21(6): 347-9, 1997.

YU, Y-H.; GINSBERG, H. N. Adipocyte signaling and lipid homeostasis. Sequelae of insulin-resistant adipose tissue. **Circ. Res.**, 96: 1042-52, 2005.

ZHANG, H. H.; HALBLEIB, M.; AHMAD, F.; MANGANIELLO, V. C.; GREENBERG, A. S. Tumor necrosis factor- α -induced stimulates lipolysis in differentiated human adipocytes through activation of extracellular signal-related kinase and elevation of intracellular cAMP. **Diabetes.**, 51: 2029-35, 2002.