

**VALÉRIA GIGLIO TOGNI**

**TRATAMENTO COM NAPROXENO, CLENBUTEROL, INSULINA E SUPLEMENTAÇÃO ORAL COM GLUTAMINA DIMINUI A VELOCIDADE DE CRESCIMENTO TUMORAL E REVERTE PARCIALMENTE A CAQUEXIA EM RATOS PORTADORES DE TUMOR DE WALKER 256**

Monografia apresentada para obtenção do título de Especialista no curso de Pós-Graduação em Fisiologia, Departamento de Fisiologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Dr. Luiz Cláudio Fernandes

**CURITIBA**

**2000**

**VALÉRIA GIGLIO TOGNI**

**TRATAMENTO COM NAPROXENO, CLENBUTEROL, INSULINA E SUPLEMENTAÇÃO ORAL COM GLUTAMINA DIMINUI A VELOCIDADE DE CRESCIMENTO TUMORAL E REVERTE PARCIALMENTE A CAQUEXIA EM RATOS PORTADORES DE TUMOR DE WALKER 256**

Monografia apresentada para obtenção do título de Especialista no curso de Pós-Graduação em Fisiologia, Departamento de Fisiologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Dr. Luiz Cláudio Fernandes

**CURITIBA**

**2000**

Candidato(a): Valéria Giglio Togni.

Título da Monografia: Tratamento com Naproxeno, Clenbuterol, Insulina e suplementação oral com Glutamina diminui a velocidade de crescimento tumoral e reverte parcialmente a Caquexia em ratos portadores de Tumor de Walker 256.

---

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Monografia de Especialização, em sessão pública realizada a 22.12.2000 considerou o(a) candidata:

(  ) Aprovado(a)

(  ) Reprovado(a)

1) Examinador(a)

*Luís António de Oliveira*

2) Examinador(a)

*Ricardo Fernandes*

3) Presidente

*Este trabalho é dedicado aos meus **pais**, cujos esforços criaram as oportunidades para a concretização dos meus sonhos, e cuja confiança me motiva a sonhar ainda mais.*

## AGRADECIMENTOS

Ao professor **Dr. Luiz Cláudio Fernandes**, pela paciência com que orientou os passos deste trabalho, permitindo minha evolução acadêmica.

À equipe do Laboratório de Metabolismo Celular do Departamento de Fisiologia da Universidade Federal do Paraná, pelas horas de trabalho dedicadas aos experimentos e pelo carinho com que compartilharam suas experiências práticas.

À professora **Dr<sup>a</sup> Carolina Arruda de Oliveira Freire**, cujos conselhos proporcionaram motivação necessária para a conclusão deste trabalho.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	xi
INTRODUÇÃO .....	1
OBJETIVOS .....	18
MATERIAL E MÉTODOS.....	19
RESULTADOS .....	27
DISCUSSÃO .....	40
CONCLUSÕES .....	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	51

## RESUMO

Caracterizada por anorexia perda de peso e intenso catabolismo do hospedeiro, a síndrome da caquexia induzida pelo câncer é considerada causa primária de 70% das mortes dos pacientes portadores de tumor. O tumor de Walker 256 (W256) tem sido utilizado como modelo experimental para o estudo da caquexia câncer induzida em ratos. A diminuição da secreção de insulina, aumento dos hormônios contrareguladores, alta produção de prostaglandinas  $E_2$  e citocinas pró-inflamatórias, são fatores envolvidos no estabelecimento da caquexia em ratos portadores de W256. Estes, somados ao metabolismo tumoral, ávido consumidor de glicose e glutamina, levam à depleção dos estoques energéticos e importante perda de massa muscular do portador, os quais não podem ser restabelecidos através de suporte nutricional. A combinação de agentes anabólicos (Insulina e Clenbuterol) à inibidores da síntese de prostaglandinas (Naproxeno), mostrou-se eficaz na reversão parcial da caquexia e na redução da taxa de crescimento do tumor W256. O presente estudo investigou se a suplementação oral com glutamina, associada a esta combinação terapêutica poderia produzir melhora significativa no quadro caquético em ratos portadores de W256, sem estimular o crescimento tumoral. Para isso, determinou-se alguns parâmetros metabólicos dos animais (glicemia, lactato sérico, conteúdo de glicogênio hepático e dos músculos sóleo e gastrocnêmio), e do peso do tumor. Houve aumento da glicemia, conteúdos de glicogênio hepático e muscular, redução do lactato sérico de todos os animais tratados e suplementados em relação aos não tratados. No grupo tratado com Naproxeno, Clenbuterol e suplementado houve recuperação total do conteúdo de glicogênio do músculo sóleo quando comparados aos animais não tratados e, interessantemente, houve ganho adicional do conteúdo de glicogênio solear quando comparados ao controle. Foi observado ainda, redução do peso do tumor em todos os grupos tratados quando comparados ao grupo sem tratamento. Os resultados mostraram que a combinação destes agentes, associados à suplementação com glutamina revertem parcialmente o quadro caquético e reduzem a taxa de crescimento tumoral, principalmente devido ao anabolismo muscular produzido no hospedeiro, mas a Glutamina não promoveu ganho adicional significativo quando comparado ao estudo onde não havia adição desta ao tratamento.

## INTRODUÇÃO

Em um organismo multicelular, as células interagem de maneira organizada e tal como um ecossistema, no entanto, essas interações são, predominantemente, cooperativas e não competitiva no meio orgânico. Segundo este ponto de vista “ecológico”, o câncer pode ser analisado como um processo microevolucionário, onde mutação, competição e seleção natural atuando dentro da população de células somáticas são os ingredientes básicos do câncer (ALBERTS et. al.,1997). O comportamento “egoísta” de algumas células acaba levando a falência de todo sistema pelos mesmos princípios que regem a evolução de todos os seres vivos.

O câncer está relacionado com distúrbios das regras fundamentais do comportamento celular nos organismos multicelulares, “sendo as células cancerosas definidas por duas propriedades hereditárias: (1) reproduzem-se em detrimento das normais, (2) invadem e colonizam territórios, normalmente, reservados para outras células” (ALBERTS et.al., 1997). Tumores podem ser divididos em benignos, quando o crescimento celular permanece contido numa massa única ou em malignos, quando conseguem invadir e se desenvolver em outros tecidos, formando metástases, sendo assim definidos como canceres. Estes últimos podem ser, ainda, classificados de acordo com o tecido e tipo celular de origem; sarcomas originam-se de tecidos conjuntivos ou musculares, enquanto que, carcinomas derivam de células epiteliais e leucemias de células hematopoiéticas (ALBERTS et. al., 1997).

Acredita-se que, o câncer possa ser produto de várias mutações somáticas acumuladas numa única célula, produzindo mudanças em seu padrão de expressão gênica (origem epigênica) ou, diretamente na seqüência de seu DNA (origem gênica) onde ambas as causas levam a célula ao descontrole do ciclo celular (ALBERTS et. al.,1997).

Enquanto o padrão gradual de crescimento do tecido normal não prejudica tecidos vizinhos, o crescimento tumoral é peculiar, alterado ao longo do tempo, produzindo prejuízo de outros tecidos (GREENSTEIN, 1954). Sugerindo, novamente, o caráter competitivo das células tumorais potencialmente letais ao hospedeiro.

Os tumores malignos podem competir com o hospedeiro por nutrientes, provocando diferentes manifestações clínicas, as mais comuns são: astenia, anorexia, perda de peso, saciedade prematura e anemia (THEOLOGIDES, 1979). Assim, o desenvolvimento tumoral pode induzir a debilidade do organismo hospedeiro, denominada de síndrome da caquexia (LAWSON et. al., 1982; THEOLOGIDES, 1979).

## **TUMOR DE WALKER 256**

Descoberto por George Walker em 1928 no John's Hopkins University School of Medicine, o qual observou desenvolvimento espontâneo de tumor em glândulas mamárias de uma rata grávida, sem metástase e cujo diagnóstico foi carcinoma. Em 1953 e 1954, esse tumor foi transplantado em ratos Sherman por inoculação subcutânea, sendo palpável em uma semana e levando a morte dos animais após seis semanas. Após 15 dias de inoculação, o tumor foi descrito como sendo uma massa firme, lobulada e encapsulada, produtor de metástases em linfonodos regionais, pulmonares e retroperitoniais (CAHILL et. al., 1943; EARLE, 1935; ELSEN, 1940; McCOY and NEUMAN, 1956; MIDER et. al., 1948).

O Carcinoma de Walker 256 ou Tumor de Walker 256 apresenta dois subtipos: tipo A metastizante, que leva a anorexia terminal dos ratos portadores em aproximadamente 27 dias; e o tipo B que não forma metástase e induz a caquexia precoce do portador, levando a morte em 15 dias. Portanto, esse último tornou-se um importante modelo para estudos da caquexia induzida pelo câncer (GUAITANI et. al., 1983), o qual foi utilizado neste trabalho.

## INTERAÇÕES METABÓLICAS ENTRE HOSPEDEIRO E TUMOR

### Mediadores da caquexia

A caquexia no câncer é o termo utilizado para resumir o estado geral caótico do portador de tumor caracterizado por um conjunto de sinais e sintomas, os quais estão presentes em dois terços dos indivíduos que morrem de câncer (ARGILES, 1999). Assim, o grau de caquexia está inversamente relacionado com prognóstico de vida do paciente (DE WYS, 1985; HARVEY, 1979). Como resultado de uma etiologia multifatorial, os mecanismos envolvidos na indução da caquexia no câncer, não são totalmente conhecidos, mas a diminuição da ingestão proteico-calórica, impossibilitando a manutenção das reservas energéticas (anorexia), é um dos achados mais freqüentes nos portadores de câncer (GIACOSA, 1996). No entanto, o fracasso na resposta dos indivíduos caquéticos ao apoio nutricional demonstrou que, o “definhamento” do portador não deva estar relacionado apenas com seu comportamento alimentar deficiente, mas também com mudanças no metabolismo intermediário ocasionadas pelo tumor (ARGILÉS et. al., 1997; SAKURAI et. al., 1998).

Interações metabólicas entre o tumor e o hospedeiro são reguladas, de modo geral, por mecanismo de “feedback” positivo que envolve anorexia e aumento da demanda energética do portador para o tumor, constituindo a chave do desenvolvimento da caquexia (ARGILES et. al., 1997).

O crescimento tumoral, assim como infecções crônicas, induzem o sistema imune a liberar mediadores químicos capazes de alterar o metabolismo de glicose, lipídios e proteínas (BEISEL, 1975; FILKINS, 1979; BARACOS et. al., 1983).

Aumento dos níveis séricos de ácidos graxos, glicose e ou, de pelo menos um tipo de aminoácido, pode provocar depressão da ingestão alimentar (HARPER, 1976). Portanto, a anorexia parece ser mais efeito do que causa do intenso catabolismo observado nos portadores de doenças crônicas ou agudas, como o câncer (ARGILÉS et al., 1997).

Nos últimos 20 anos, o estudo crescente da síndrome da caquexia demonstrou o envolvimento de mediadores químicos na produção deste quadro, tornando claro que este é secundário a anormalidades metabólicas produzidas por subprodutos do tumor, associados às citocinas liberadas pelo sistema imunológico frente a um estímulo invasor (ARGILÉS et. al., 1997; GAGNON e BRUERA, 1998; TISDALE, 1996).

Sintetizado por macrófagos em resposta à agressão, o Fator de Necrose Tumoral (TNF) é reconhecido por vários receptores celulares, produzindo efeitos biológicos diversos como: promoção ou inibição do crescimento celular, angiogênese, citotoxicidade e imunomodulação (AGGARWAL e NATARAJAN, 1996). Sua presença diminui a atividade da enzima lipase lipoproteica (LPL) no tecido adiposo, produzindo hipertrigliceridemia por comprometimento da hidrólise de triglicerídios; redução de acetil CoA carboxilase (enzima lipogênica) e do transporte de glicose em adipócitos, comprometendo o substrato para lipogênese (ARGILES et. al., 1997 ; TORTI et. al., 1985). Recentemente, foi dado ênfase ao TNF-1 como sendo o principal fator mediador das mudanças no metabolismo de Nitrogênio observado em portadores de câncer caquéticos (ARGILÉS et. al., 1999).

As Interleucinas (IL) como, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6 e  $\gamma$ -Interferon são peptídios e proteínas secretadas pelas células do sistema imune, mediando as interações entre leucócitos para a produção resposta imunológica, mas que não ligam antígenos. No entanto, elas podem possuir origem e ação em outros tipos celulares, como é o caso das IL-1 e IL-6, sendo então, chamadas de citocinas (ALBERTS et. al., 1997).

O desenvolvimento da caquexia em ratos portadores de tumor foi observado mesmo na ausência do TNF, sugerindo o envolvimento de algumas interleucinas nas alterações produzidas no metabolismo de proteínas. Foi mostrado que IL-2 (NOGUCHI et. al., 1996); IL-6 e  $\gamma$ -Interferon são mediadores da proteólise em alguns tipos de tumores (ALBRECH, 1996; MATTHYS et. al., 1997; NELSON et. al., 1994).

As prostaglandinas são substâncias formadas, principalmente a partir do ácido araquidônico, pela ação da enzima cicloxigenase neste fosfolípido de membrana. A síntese e liberação de prostaglandinas da série E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) é estimulada quando há lesão celular, sendo seus efeitos associados aos sintomas encontrados nos processos inflamatórios, infecciosos e ou neoplásicos ( febre, dor, perda de apetite e hipermetabolismo). A associação de IL-1 e TNF estimula a síntese de PGE<sub>2</sub> em vários tecidos periféricos (DAYER et. al., 1985). Investigações sobre o envolvimento de PGE<sub>s</sub> na indução da caquexia no câncer mostraram que, em ratos portadores de leucemia, o hipermetabolismo observado é induzido pela produção de PGE<sub>s</sub> periféricas (ROE et. al., 1997). Ratos portadores de carcinoma de Walker 256 apresentam elevadas taxas de PGE<sub>2</sub> e vasopressina, o que é mencionado como um dos principais fatores envolvidos nas alterações metabólicas e hormonais que induzem à caquexia (SIDDIQUI e WILLIAMS, 1987).

Em resumo, apesar do TNF ter importante papel como mediador da caquexia em indivíduos portadores de tumor, os desarranjos metabólicos observados nesta síndrome não são provocados somente por este fator (ARGILÉS et. al., 1997).

## Alterações no Metabolismo de Carboidratos, Lipídios e Proteínas

Possivelmente, pelo fato da maioria dos tumores apresentarem metabolismo preferencialmente anaeróbico (ARGILÉS et. al., 1997), evidenciado pelas elevadas concentrações de ácido láctico sérico observadas no hospedeiro (HEBER et. al., 1985; WATERHOUSE, 1974). WARBURG, em 1930, demonstrou que tumores agressivos consomem grandes quantidades de glicose, o que é condizente com o aumento da produção de glicose observada nos indivíduos portadores destes tipos de tumores (BARAI et. al., 1980).

O ácido láctico é convertido em glicose no fígado do hospedeiro (gliconeogênese), mantendo o nível sérico desse substrato. Assim, o tumor se torna o maior consumidor de glicose, enquanto o portador é estimulado a fabricá-la. Esse mecanismo, conhecido como ciclo de Cori, encontra-se aumentado e pode representar um prejuízo energético de 300 kcal/dia para o indivíduo portador de tumor (EDEN et. al., 1984). Assim, o metabolismo tumoral estimula a ativação de mecanismo hepático compensatório no portador (pela hiperlaticidemia) para aumento da produção de glicose, que supre a demanda energética exacerbada do próprio tumor.

A ação das citocinas e demanda energética do tumor, apesar de cruciais, não seriam suficientes para produzir desvio metabólico tão acentuado no portador. Isto levou a sugestão de que o desenvolvimento de intolerância à glicose, observada em alguns indivíduos portadores de tumor, seria também fator agravante para essas alterações no metabolismo de carboidratos, fato que foi relacionado com a resistência à insulina observada nestes indivíduos (TAYEK, 1992). Ratos portadores de tumor de YOSHIDA (AH-130), apresentam acentuada perda de peso associada à anorexia e ao hipermetabolismo de lipídios e proteínas,

sugerindo que tais alterações sejam secundárias à hipoinsulinemia e ou ao aumento de hormônios contrareguladores como, catecolaminas, cortisol e glucagon, também observados nestes animais (COSTELLI et. al., 1999). A importância das alterações na secreção de insulina para o desenvolvimento do quadro caquético está, claramente, evidenciada nos portadores de tumor de Walker 256, promovendo a ativação das vias catalíticas no organismo hospedeiro (FERNANDES et. al. 1990; COSTELLI et. al, 1999). A degradação do glicogênio hepático (glicogenólise) libera grandes quantidades de glicose dos estoques energéticos do portador (RIVIERA et. al., 1988).

A gordura constitui 90% das reservas nutritivas do organismo adulto, sua dissolução é importante fator para o desenvolvimento da caquexia induzida pelo câncer (PRESTON et. al., 1987). A redução dos estoques de lipídios e a hiperlipidemia, observadas em pacientes portadores de tumor, podem ser resultado do aumento da atividade lipolítica, liberando glicerol para a gliconeogênese hepática e ácidos graxos para serem utilizados como substrato alternativo da glicose pelos tecidos periféricos (THOMPSON et al., 1981). A diminuição da atividade da lipase lipoproteica (LPL) produz hipertrigliceridemia e compromete o acúmulo de lipídios em tecido adiposo (THOMPSON et. al., 1981; NOGUCHI et. al., 1996). A menor atividade das enzimas-chave da lipogênese, acetil-CoA carboxilase e ácido graxo sintetase, observada em indivíduos portadores de tumor (TORTI et. al., 1985), leva a impossibilidade de sintetizar "novo" ácido graxo.

A astenia, diminuição da força muscular, é evidenciada em doenças crônicas, especialmente no câncer. Observa-se, na síndrome da caquexia induzida pelo tumor, intenso catabolismo protéico dos músculos esqueléticos, os quais detêm praticamente a metade da massa protéica corpórea (LAWSON et. al., 1982; TISDALE, 1997).

Fisiologicamente, durante o jejum, aminoácidos são mobilizados do músculo esquelético para o fígado, sendo substratos para a gliconeogênese induzidos pela ativação das vias catalíticas, mas a redução muito prolongada da ingestão alimentar leva a diminuição da degradação das proteínas musculares, evitando desequilíbrio de nitrogênio e depleção muscular. Esse mecanismo de conservação de nitrogênio está ausente em indivíduos portadores de câncer que desenvolvem caquexia, produzindo balanço negativo de nitrogênio, cujos fatores responsáveis não são completamente conhecidos (ARGILÉS et. al., 1997).

RENNIER et. al., (1989) sugeriram que a degradação protéica é secundária à lentidão na síntese de proteínas. Outros estudos observaram intensa atividade proteolítica na musculatura periférica (LUNDHOLM et. al., 1982), indicando possivelmente, o envolvimento de ambos os fatores na produção da astenia no câncer (TESSITORE et. al., 1987; CARBÓ et. al., 1994). ARGILÉS et. al., (1997) identificaram um mecanismo proteolítico muscular ativado durante a caquexia, o qual envolve uma enzima proteolítica não-lisossomal dependente de ubiquitina e ATP, alterando o metabolismo de nitrogênio, sugerindo ainda que, o TNF-1 seja o principal mediador desse mecanismo (ARGILÉS et. al., 1999). A inibição do transporte de aminoácidos para o músculo esquelético durante o crescimento tumoral, foi mencionado como fator potencializador da mobilização de aminoácidos musculares (ARGILÉS et. al., 1997).

Apesar, da glicólise ser o principal processo para obtenção de energia nas células tumorais (LAZO, 1981; PEDERSEN, 1978; SCHNEIDER e HOGEBOM, 1950), a utilização de aminoácidos essenciais (leucina, valina e isoleucina) como substrato energético também é descrita, devido ao aumento da taxa de oxidação e leucina (ARGILÉS e LÓPEZ-SORIANO, 1990; COSTELLI et. al., 1995), ou ainda, pela rápida extração de alanina e glutamina, observada em alguns tumores (FICHER e CHANCE, 1990). Portanto, o intenso quadro catabólico que se instala no indivíduo portador de tumor, debilitando-o e reduzindo suas perspectivas de recuperação, não é causado apenas

por má nutrição, mas também pelas alterações no metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídeos que ocorrem devido ao aumento da demanda energética gerada pela presença do tumor. Isto é conseguido pela ativação do mecanismo hepático compensatório (gliconeogênese) para manutenção plasmática de substratos energético para o hospedeiro, os quais são captados pelo tecido tumoral. Participam também, no desenvolvimento deste quadro, a hipoinsulinemia, aumento de citocinas e dos hormônios contrareguladores cortisol, glucagon e catecolaminas (ARGILÉS et. al., 1997; FERNANDES et. al. 1990). Assim, o combate aos efeitos danosos da caquexia induzida pelo tumor requer terapia alternativa, antagonizando essas alterações metabólicas (TISDALE, 1997).

## GLUTAMINA

A glutamina é utilizada por todas as células, de modo geral, como fonte doadora de nitrogênio para a síntese de purinas e pirimidinas. Além disso, é importante veículo para o transporte de esqueletos de carbono e nitrogênio entre os diferentes tecidos, representando 20% do conteúdo de aminoácidos livres no sangue (CURI, 2000). Células de proliferação rápida como enterócitos, linfócitos, fibroblastos e células tumorais são grandes consumidoras deste aminoácido, não somente como precursor biossintético (BRAND et. al., 1989), mas também como substrato energético para a proliferação celular (CURI, 2000; NEWSHOLME et. al., 1985).

A glutamina da dieta é utilizada completamente pelos enterócitos, portanto sua concentração plasmática é mantida por órgãos capazes de produzi-la e liberá-la, como o fígado e músculo esquelético (CURI, 2000). O músculo esquelético é a principal fonte de glutamina, podendo disponibilizá-la para outros órgãos ou tecidos, dependendo da demanda (PARRY-BILLINGS et. al., 1991). Este sistema de comunicação orgânico, através do remanejamento de glutamina inter-órgãos, ocorre nas diferentes situações fisiológicas ou patológicas, tornando o músculo esquelético o principal sítio produtor de glutamina, enquanto rins, intestino, sistema nervoso, células do sistema imune, os principais consumidores (CURI, 2000; NEWSHOLME et. al., 1989).

O músculo esquelético é capaz de sintetizar e de consumir glutamina, pois apresenta atividade das duas principais enzimas envolvidas no metabolismo deste aminoácido (CURI, 2000). A glutaminase (dependente de fosfato), catalisa a hidrólise de glutamina em glutamato e íons amônio (CURTHOY et. al., 1995), e a glutamina sintase (GS) que converte glutamato em glutamina à partir do amônio (MEISTER, 1968, 1995).

Assim, a desaminação de aminoácidos de cadeia ramificada e a proteólise constante em músculo esquelético, fazem deste tecido quase que o produtor exclusivo de glutamina, mesmo em condições fisiológicas (CURI et. al., 1987). No jejum, ocorre aumento da atividade proteolítica no músculo, liberando aminoácidos das proteínas musculares para a desaminação e transaminação, sendo estes utilizados como substrato para a síntese de glutamina (atividade de GS) e conseqüente liberação desta para o sangue (NEWSHOLME et. al., 1989; ARDAWI, 1990).

Através da glutamina, íons amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) chegam aos rins para serem eliminados, auxiliando assim a regulação do equilíbrio ácido-base (SMITH, 1990). No fígado, a glutamina além de permitir a formação de uréia, seus esqueletos de carbono são utilizados para síntese de glicose (gliconeogênese), e manutenção da glicemia durante o jejum (NEWSHOLME et. al., 1989).

Células de proliferação rápida, como células do sistema imune, são ávidas consumidoras de glutamina circulante. A alta taxa de glutaminólise, detectada em linfócitos ativados, sugeriu algumas hipóteses para o papel da glutamina nestas células: (1) fornecimento de energia para a proliferação, apesar da oxidação da glutamina ser apenas parcial na glutaminólise, ocorre formação de 12 moles de ATP; (2) fonte de nitrogênio para a síntese de purinas e pirimidinas, de Carbono para síntese de nucleotídeos e de lipídios estruturais, em períodos específicos do ciclo celular (CURI, 2000); (3) fornecimento de precursores para síntese de citocinas, necessárias para a diferenciação dos linfócitos e para sua intercomunicação com os diferentes tipos de células do sistema imune, durante a resposta imunológica (ROHDES et. al., 1996; HORIG et. al., 1994; KIMBERG et. al., 1996).

A glutamina é considerado um aminoácido gliconeogênico não-essencial, pois pode ser sintetizado pelo organismo. No entanto, em condições de maior demanda de glutamina, como infecção e neoplasia, os órgãos produtores não conseguem manter os níveis normais de glutamina plasmática, assim, esta vem sendo reclassificada como aminoácido "condicionalmente essencial" (LACEY e WILMORE, 1990). De fato, RENNIER et. al., (1994), observaram que a redução do "pool" de glutamina livre no músculo esquelético, em situações patológicas, pode ser ocasionada por alteração na atividade dos transportadores deste aminoácido, através da membrana que, podem sofrer regulação adaptativa em resposta à mudança na concentração de glutamina extracelular. A redução de glutamina plasmática induz ao aumento da síntese de glutamina muscular e a sua liberação, enquanto o aumento nos níveis plasmáticos deste aminoácido, por infusão intravenosa ( por exemplo), parece estimular a síntese de glicogênio muscular (VARNIER et. al., 1995). Assim, o aumento da demanda de glutamina pode levar a redução plasmática deste aminoácido, cujas implicações resultam em prejuízo dos processos anabólicos no músculo esquelético. Isto sugere a existência de um mecanismo de sinalização osmótica (envolvendo a glutamina) para regulação do metabolismo de proteínas do corpo inteiro (RENNIER et. al., 1996). Apesar de não completamente esclarecidos os mecanismos sinalizadores na modulação da atividade dos transportadores de glutamina da fibra muscular, o influxo desta parecer ser estimulado pela ação da insulina, enquanto o efluxo por ação de glicocorticóides (RENNIER et. al., 1989, 1995).

A glutamina é o aminoácido mais importante para as células tumorais. SOUBA et. al., (1993) observaram que a utilização de glutamina pelo fibrossarcoma era 45% maior que em qualquer outro órgão do organismo hospedeiro. Os tumores parecem utilizar glutamina como fonte de precursores biossintéticos (MACKEEHAN et. al., 1982; BRAND, 1985; DEMETRAKOPOULOS et. al., 1982). Provavelmente, devido a falta de enzimas específicas, as células tumorais

apresentem dificuldade em sintetizar aminoácidos, assim, o tecido tumoral desenvolve eficientes sistemas de transporte de glutamina para aumentar a captação plasmática deste aminoácido, o qual foi previamente sintetizado e disponibilizado pelo hospedeiro (JOHNSTONE e SCHOLEFIELD, 1982; CHRISTENSEN, 1990).

Deste modo, o aumento da demanda de glutamina nas células do sistema imunológico (NEWSHOLME, 1996), associado a elevada captação desta pelo tumor, aumentam a necessidade de glutamina disponível no sangue (FERNANDES et. al., 1996).

PARRY-BILLINGS et. al., (1991), mostraram uma relação direta entre taxa de crescimento tumoral e redução da concentração de glutamina muscular, sugerindo este tecido como a fonte mantenedora da glutamina plasmática durante a caquexia, explicando a perda de massa muscular observada em indivíduos portadores de tumor (ARGILÉS et. al., 1997, 1999; CHEN et. al., 1993; KLIMBERG et. al., 1990).

O tumor de Walker 256, é grande consumidor de glutamina, apresentando a alta taxa de glutaminólise e produzindo queda da glutamina plasmática, o que foi sugerido como principal responsável pela depleção muscular e o rápido desenvolvimento do quadro caquético em ratos portadores de tumor de Walker 256 (PARRY-BILLINGS et. al., 1991).

Apesar do risco de promover o crescimento tumoral, a manutenção dos níveis plasmáticos de glutamina, através de suplementação oral, pode ser uma opção racional no combate à caquexia em portadores de tumor de Walker 256 (SOUBA, 1993).

## **ESTRATÉGIA PARA A REVERSÃO DA CAQUEXIA**

Apesar das terapias utilizadas no combate ao câncer nos últimos anos propiciarem prognóstico favorável, sua eficácia, na maioria dos casos, está comprometida pelo desperdício progressivo de energia do portador de tumor, conduzindo-o a morte, pela simples impossibilidade deste em suportar o tratamento.

Torna-se evidente, que a caquexia é um quadro complexo que não pode ser sanado apenas com suplementação alimentar oral, enteral ou parenteral (TISDALE, 1997; SAKURAI, 1998; PEARLSTONE, 1995). Algumas evidências sugerem que o aumento de peso corpóreo, observado em pacientes caquéticos submetidos à suplementação parenteral, não está relacionado com aumento de massa corpórea, mas sim com retenção de água, devido ao aparecimento de edema periférico e diminuição do hematócrito (EVANS et. al., 1985).

Como comentamos anteriormente, a síndrome da caquexia no câncer é multifatorial envolvendo alterações metabólicas, hormonais e imunológicas, as quais induzem a anorexia e intenso catabolismo do hospedeiro (FERNANDES et. al., 1991; TRACEY et. al., 1987).

As estratégias farmacológicas sugeridas para combater à caquexia são divididas resumidamente em dois grupos, segundo os principais fatores causadores da caquexia: as que combatem a anorexia, portanto estimuladoras do apetite, e as que atuam nos desarranjos metabólicos (ARGILÉS et. al., 1997).

Corticóides e progestágenos são administrados com o objetivo de aumentar a ingestão proteico-calórica (ARGILÉS et. al., 1997; PUCCIO, 1997), no entanto, o aumento de peso dos portadores de câncer demonstrados nestes casos, foi acompanhado pelo dobro do aumento da massa tumoral, ou ainda, com retenção líquida e nenhum aumento significativo de massa magra no hospedeiro (ARGILÉS et. al., 1997).

HOLDEN et. al.,(1996) propôs um modelo para estudos de anorexia e bulimia nervosa, onde a causa primária desses problemas seria o elevado nível de TNF observado nos pacientes com anorexia e ou bulimia nervosa, bem como para anorexia em portadores de tumor que desenvolveram caquexia (HOLDEN et. al., 1996). A talidomida, como inibidor da síntese do TNF, foi usada como intervenção terapêutica levando a ganho de peso em pacientes portadores do vírus da imunodeficiência humana, acometidos pela tuberculose (HASLETT, 1998). No entanto, seus efeitos sobre o sistema imune não são completamente conhecidos (MATTHY, 1997; HASLETT, 1998).

Antiinflamatórios não esteróides, derivados do ácido propiônico, como a Aspirina e Piroxicam foram investigados e demonstraram eficácia no combate à caquexia no câncer e na redução da febre neoplásica em indivíduos portadores de tumor (HOMEM-DE-BITTENCOURT et. al., 1989; JOHNSON et. al., 1996; SHIFF et. al., 1996; LIAW et. al.,1998).

Drogas que atuam contrariamente às alterações metabólicas induzidas pelo tumor são sugeridas como estratégia de combate à caquexia. Segundo Gold, o quadro caquético desenvolvido pelo portador de câncer, é resultado das alterações no metabolismo de carboidratos encontradas nestes pacientes (GOLD et. al., 1974). O Sulfato de Hidrazina, inibidor da gliconeogênese, foi testado em portadores de câncer de pulmão, demonstrando eficácia na diminuição da gliconeogênese e da atividade do ciclo de Cori, aumentando o tempo de vida destes pacientes (CHLEBOWSKI et. al., 1990).

Contraopondo-se a mobilização de lipídios, perda de massa gorda e reduzindo o crescimento tumoral, os ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 (PUFA  $\omega$ -3 poliinsaturados ou PUFA) vêm sendo descritos como opção contra a depleção dos depósitos energéticos do portador de tumor (TISDALE, 1993).

Inibidores proteolíticos e agentes proteogênicos foram sugeridos como possíveis estratégias para reversão da caquexia, por suas ações antagônicas àquelas provocadas pela presença do tumor (TISDALE, 1997; MATTHYS, 1997; GAGNON e BRUERA, 1998), destacando-se o uso de anabolizantes musculares como os agonistas  $\beta_2$ - adrenérgicos (STALLION et.al., 1993).

O tratamento com insulina exógena mostrou melhorar a anorexia e a perda de massa muscular dos indivíduos portadores de tumor (FERNANDES et. al., 1991; MOLEY, 1987; TESSITORE, 1993).

## OBJETIVOS

O presente estudo tem como objetivo investigar se o tratamento com Naproxeno, Clenbuterol e insulina associados a suplementação oral com glutamina melhora o quadro caquético e a velocidade de crescimento tumoral em indivíduos portadores de Tumor de Walker 256.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **ANIMAIS**

Para a realização desse estudo utilizou-se ratos machos adultos da linhagem Wistar, obtidos do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Os animais foram submetidos a ciclo claro/escuro (12/12 horas) com água e alimentação à vontade.

### **REAGENTES, ENZIMAS E HORMÔNIO**

Todos os componentes dos tampões foram obtidos da Reagen Quimibrás Industria Brasileira S/A. Lactato desidrogenase, amiloglicosidase, Hexoquinase/Glicose-6-fosfato desidrogenase, NAD, NADH, NADPH e ATP foram provenientes da Sigma Chemical Co. Insulina utilizada foi proveniente da Biobrás. A Glutamina foi gentilmente cedida pelo NUTERAL Divisão de Suplementos Nutricionais. Naproxeno foi obtido da Syntex Corporation e o Clenbuterol da Boeringer Ingelheim.

## **OBTENÇÃO E TRANSPLANTE DAS CÉLULAS DO TUMOR DE WALKER 256**

A partir de um animal portador do tumor sólido (tipo B) foi retirado o tecido tumoral e colocado em solução salina 0,9% em gelo. Com auxílio de uma tesoura, foram retiradas e descartadas as porções necrosadas e as porções de tecido vivo foram separadas e cortadas em pequenos pedaços, as quais foram transferidas para um béquer contendo salina gelada. Através do uso de um liquidificador, os pedaços de massa tumoral foram triturados. A seguir, o material homogeneizado foi filtrado em gaze, transferido para tubos de plástico de 50ml e centrifugado a 4°C, por 10min. à velocidade de 1400-1500rpm. Terminada a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e ressuspenso em salina 0,9%. Após a contagem do número de células em câmara de Neubauer, 1ml dessa suspensão ( $2 \times 10^7$  células) foi injetado subcutaneamente no flanco direito dos animais sem anestesia. No grupo Controle foi injetado 1ml de salina 0,9%. A quantidade inoculada assegurou que a massa tumoral representasse pelo menos 7 a 10% do peso da carcaça do animal ao final do período experimental.

## **PROTOCOLO EXPERIMENTAL**

Os animais foram divididos em grupos Controle (CNT), Controle + Glutamina (CNT+G), Portadores de Tumor (RPT), Portadores de Tumor tratados com Glutamina + Naproxeno (RPT+G+N), Portadores de Tumor tratados com Glutamina + Naproxeno + Clenbuterol (RPT+G+N+C) e Portadores de Tumor tratados com Glutamina + Naproxeno + Clenbuterol + Insulina (RPT+G+N+C+I).

Após 4 dias, quando o tumor era palpável, iniciaram-se os diferentes tratamentos. O peso corpóreo foi monitorado a cada dois dias, sendo os animais tratados por 10 dias. No 14º dia os animais foram sacrificados, o sangue, fígado e músculo esquelético retirados para posterior análise bioquímica. O coração e o tumor também foram retirados e pesados.

## **TRATAMENTOS**

### **Insulina**

A Insulina (NPH U-100 Biobrás), dose de 1U/100g p.c., foi administrada por injeção subcutânea em dias alternados, sempre no mesmo horário – após às 16:30h, evitando assim, morte por hipoglicemia. O tratamento foi iniciado no 4º dia após a inoculação das células tumorais.

### Naproxeno

No 4º dia após a inoculação do tumor iniciou-se o tratamento com Naproxeno, na concentração de 0,1 mg/ml adicionado a água de beber.

### Clenbuterol

O Clenbuterol, dose de 0,15 mg/kg p.c. foi administrado diariamente, através de injeções subcutâneas no flanco esquerdo dos animais, no 4º dia após a inoculação das células tumorais.

### Glutamina

No quarto dia após a inoculação da suspensão de células tumorais, iniciou-se a suplementação oral com Glutamina di-peptídeo adicionada a água de beber (0,35 mg/ml).

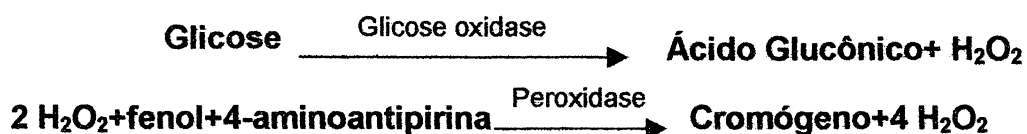
### **DETERMINAÇÃO DA MASSA DO TUMOR, CORAÇÃO E CORPÓREA**

A massa do tumor e do coração dos animais foram aferidas em balança digital Denver Instrument XL-410, tomando-se o cuidado de retirar o excesso de sangue do coração antes da pesagem. Durante o experimento, os animais foram pesados a cada dois dias sempre no período da tarde, utilizando-se balança Denver Instrument XL-410.

## PROCEDIMENTOS BIOQUÍMICOS

### Determinação da Glicemia

A concentração de glicose circulante foi realizada pelo método enzimático colorimétrico; utilizando-se Kit Glicose E enzimática da Labtest, segundo TRINDER, (1969). A Glicose presente na amostra é dosada segundo a reação:



A intensidade de cor emitida é diretamente proporcional à quantidade de glicose na amostra de soro. A leitura de absorbância foi feita no espectrofotômetro ULTROSPEC 2000 (Pharmacia) a 505nm. A concentração de glicose foi expressa em mg/dl, foi calculada pela fórmula:

$$[\text{Glicose}] = \frac{\text{D.O. amostra}}{\text{D.O. padrão}} \times n$$

-[Glicose] = Concentração de glicose da amostra

-D.O.= Densidade óptica

-n = Concentração do padrão (100 mg/100 ml)

## Determinação do Lactato Sérico

Determinado por método enzimático, segundo ENGLE & JONES (1978). Inicialmente, foi realizada a desproteinização do soro, pela adição de 50µl de ácido tricloroacético (TCA à 25%) e a mistura agitada em vortex, centrifugada por 1 minuto a 13000 rpm. Em seguida, foram coletados 200 µl do sobrenadante e foi adicionado 2µl de indicador universal para permitir a visualização da neutralização do soro, pela adição de KOH/TRIS (0,5M/2M), sinalizada pela coloração verde, indicando pH 7.0. Em seguida, 100µl do soro neutralizado foi pipetado em tubos de ensaio contendo 1ml do tampão de ensaio (descrito abaixo) e, após 45 minutos efetuada a leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 340nm. O princípio dessa mensuração consiste na conversão de lactato a piruvato pela ação da Lactato desidrogenase (LDh), ocorrendo consumo de NAD<sup>+</sup> com formação estequiométrica de NADH, o qual pode ser monitorado espectrofotometricamente, fornecendo as concentrações de lactato existente na amostra. Segundo a reação:



A medida da absorbância para o lactato sérico, é em µmol/ml, pela fórmula:

$$[\text{Lactato}] = \frac{\text{D.O.}}{6,22} \times \frac{\text{V1}}{\text{V}} \times \frac{\text{V2}}{\text{V3}} \times \frac{\text{V4}}{\text{V5}}$$

-[Lactato] = Concentração de lactato produzido

-D.O. = Densidade óptica da amostra

-6,22 = Constante

-V1 = Volume da amostra + tampão de ensaio

-V = Volume da amostra

-V2 = Volume do soro com proteínas + TCA

-V3 = Volume do soro com proteínas

-V4 = Volume do soro desproteinizado + volume de neutralização

-V5 = Volume do soro desproteinizado

<b>TAMPÃO DE ENSAIO</b> <b>(para 100ml de H<sub>2</sub>O destilada)</b>	
EDTA	0,28g
Glicina	2,8g
Hidrato de Hidrazina	1,5ml
LDh	0,4ml
NAD <sup>+</sup>	60mg
pH	8.85

### **Determinação do Conteúdo de Glicogênio**

Fígado, músculo gastrocnêmio e sóleo foram retirados dos animais, e seus conteúdos de glicogênio determinados segundo LEIGHTON *et al.* (1989). Colocou-se esses tecidos em diferentes tubos de ensaio contendo 500 µl de KOH (1M) e deixados em banho (aproximadamente 60° C) por 20 a 30 minutos, para digestão desses tecidos. Em seguida, as amostras foram agitadas no vortex e 100µl de cada amostra foram pipetados em tubos de ensaio contendo 17 µl de ácido acético glacial e 500 µl do tampão acetato com amiloglicosidase (atividade 5000-8000 U/ml) e submetidas ao banho-maria (37° C) por 2 horas. Retiradas do banho, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 1400 rpm e 100 µl de cada amostra foram colocados em novos tubos de ensaio contendo 1000 µl do tampão Trietanolamina.

Após 40 minutos realizou-se a leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 340 nm. O conteúdo de glicogênio existente na amostra de tecido foi calculado em  $\mu\text{mol/g}$  de tecido, pela fórmula:

$$\text{C. Glicogênio} = \text{D.O.} \times 8,85 \times \frac{1}{m}$$

- D.O. = Densidade óptica da amostra

- 8,85 = Constante

- m = Massa de tecido colhido (g)

<b>TAMPÃO ACETATO (100ml)</b>	
Ácido glacial(96%)	480 $\mu\text{l}$
Acetato de Na <sup>+</sup>	975mg
pH	4.8
<b>TAMPÃO TEA (100ml)</b>	
Trietanolamina	5,6g
MgSO <sub>4</sub>	0,074g
ATP	0,490g
NADP	0,050g
HK/G6PDh	600 $\mu\text{l}$
pH	7.5

### **ANÁLISE ESTATÍSTICA**

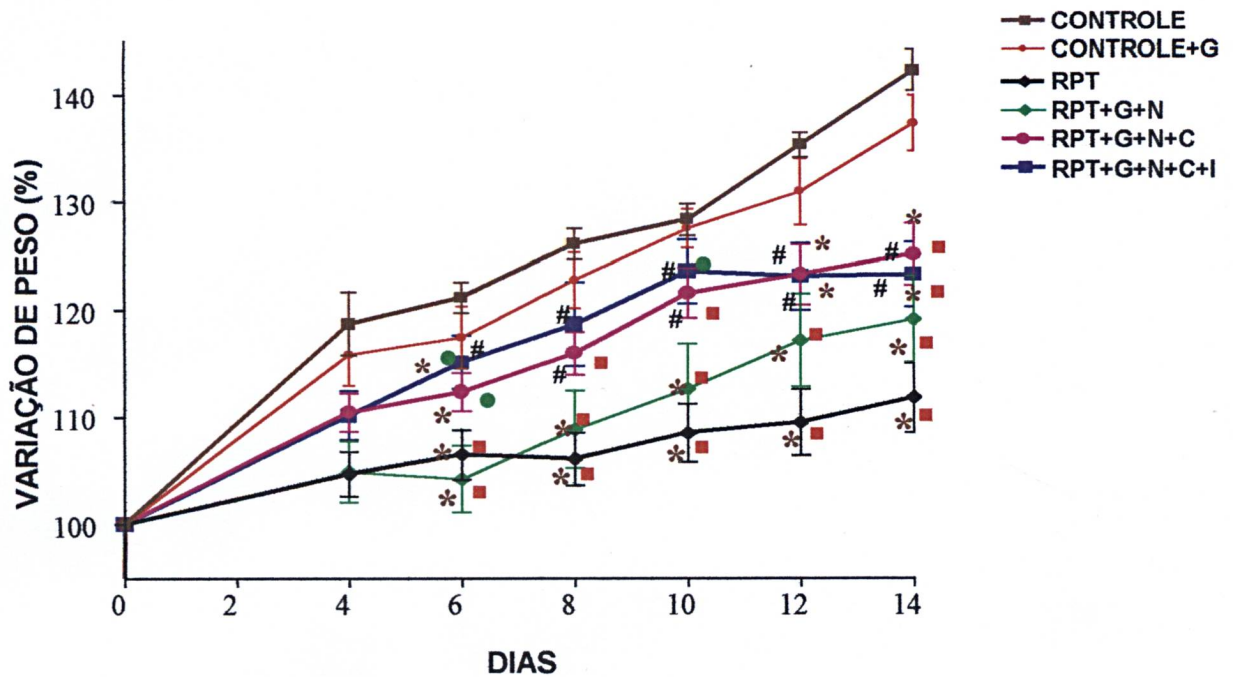
As diferenças entre as médias  $\pm$  erro padrão dos grupos experimentais foram avaliadas por análise de variância (ANOVA) e o pós-teste utilizado foi o de TUKEY, com nível de significância de  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

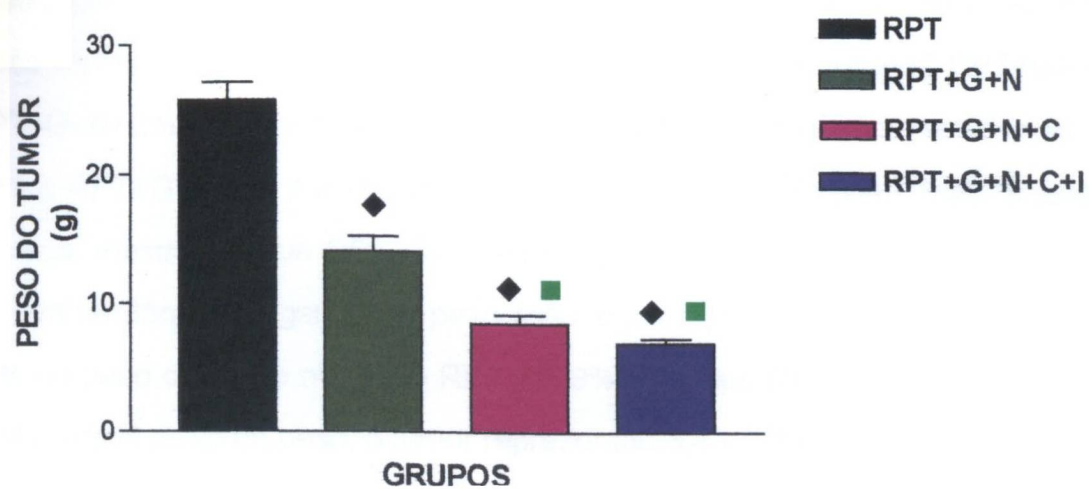
### DETERMINAÇÃO DO PESO CORPÓREO, PESO FRESCO DO TUMOR E CORAÇÃO DOS GRUPOS ESTUDADOS

A figura 1 mostra porcentagem de variação do peso corpóreo dos grupos estudados. Os grupos Controle (CNT) e Controle + Glutamina (CNT+G) no final de 14 dias tiveram um aumento de peso significativo de, aproximadamente 40%. O grupo Portador de Tumor (RPT) não tiveram um ganho significativo de peso para o mesmo período, quando comparados ao CNT e CNT+G. O grupo RPT+G+N apresentou aumento de peso de 10%, mas isto não foi diferente ( $p>0,05$ ) quando comparado ao grupo RPT. Os grupos RPT+G+N+C e RPT+G+N+C+I apresentaram ganho de peso idêntico, sendo que nestes grupos o aumento de peso foi 40% maior, quando comparados ao grupo RPT ao final de 14 dias ( $p>0,05$ ), mostrando ser significativo à partir do 8<sup>a</sup> dia, no entanto, ficaram abaixo do ganho obtido pelo grupo CNT e CNT+G ( $p<0,05$ ).

Na figura 2 estão representados os valores do peso úmido do tumor dos animais tratados e não tratados. Houve redução significativa da massa tumoral em todos os grupos tratados, sendo que no grupo RPT+G+N, esta foi de 1,8 vezes, no RPT+G+N+C foi de 3,0 vezes e no grupo RPT+G+N+C+I 3,7 vezes menor, quando comparados ao grupo RPT.



**FIGURA 1:** Porcentagem de variação de peso corpóreo dos ratos dos grupos controle (CNT); CNT + Glutamina (CNT+G); com tumor (RPT) e dos grupos com tumor tratados com Glutamina + Naproxeno (RPT+G+N); Glutamina + Naproxeno + Clenbuterol (RPT+G+N+C); Glutamina + Naproxeno + Clenbuterol + Insulina (RPT+G+N+C+I). \* Diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos estudados quando comparada ao grupo CNT. ■ Diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos estudados quando comparada ao grupo CNT+G. # Diferença significativa entre os grupos estudados ( $p < 0,05$ ) quando comparada ao grupo RPT. ● Diferença significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparada ao grupo RPT+G+N. Os dados estão representados como média  $\pm$  EPM de 10 animais por grupo.



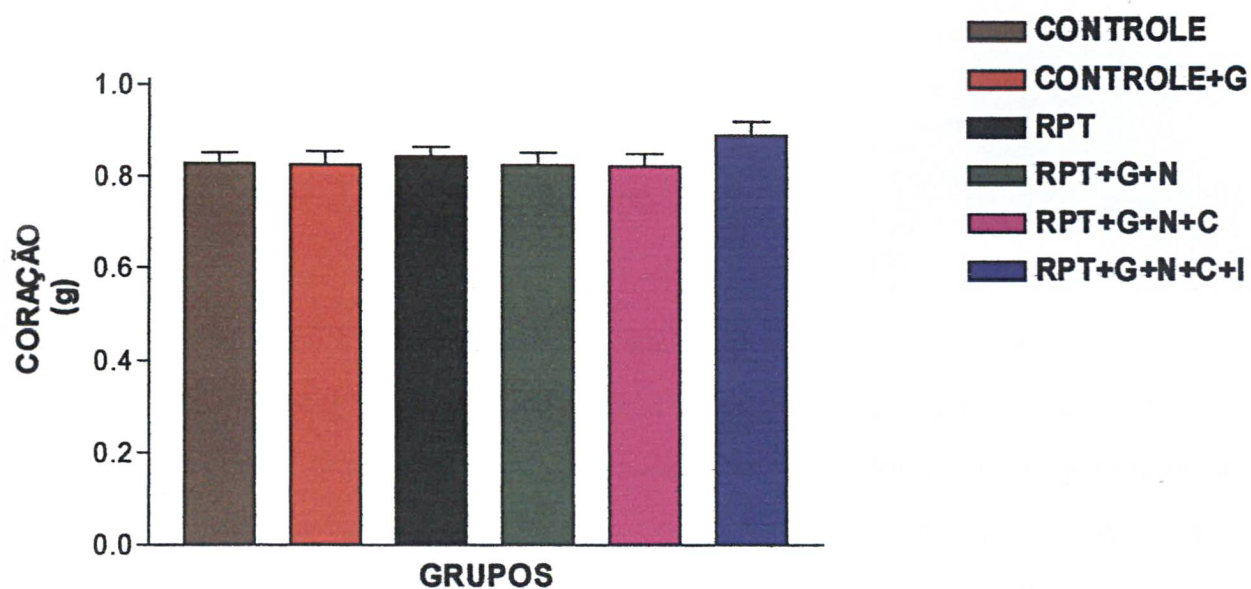
**FIGURA 2:** Peso do tumor dos grupos RPT; RPT+G+N; RPT+G+N+C e RPT+G+N+C+I. ◆ Diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos experimentais quando comparados ao RPT. ■ Diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos experimentais quando comparada ao grupo RPT+G+N. Os dados estão representados como média  $\pm$  EPM de 10 animais por grupo.

Os dados do peso inicial (PI), peso final (PF), peso fresco do tumor (PT) e peso da carcaça (PF-PI) do grupo portador de tumor e portadores de tumor tratados estão representados na tabela 1. Ao final de 14 dias, os grupos RPT+G+N+C e RPT+G+N+C+I tiveram ganho de peso significativo, quando comparados ao grupo RPT e RPT+G+N. Ao ser descontado o peso do tumor do peso final, têm-se o da carcaça, mostrando que RPT não tiveram ganho de peso corpóreo, os RPT+G+N tiveram tendência ao ganho de peso (não significativa), onde o tumor representou 10% do peso corpóreo no grupo RPT e 5,9% no grupo RPT+G+N. Nos grupos com ganho significativo de peso, o tumor representou 3,4 e 2,7% respectivamente.

O peso médio do coração dos animais dos grupos experimentais estão representados na figura 3. Os diferentes tratamentos não promoveram aumento significativo da massa cardíaca.

**TABELA 1:** Peso inicial, peso final, peso do tumor e da carcaça dos grupos: com tumor (RPT); tumor tratados com Glutamina + Naproxeno (RPT+G+N); Glutamina + Naproxeno + Clenbuterol (RPT+G+N+C); Glutamina + Naproxeno + Clenbuterol + Insulina (RPT+G+N+C+I). Os valores representam a média  $\pm$  EPM de 10 animais por grupo. <sup>▲</sup> Diferença significativa ( $p < 0,05$ ) quando compara-se peso inicial e final dos animais do mesmo grupo. <sup>♦</sup> Diferença significativa entre os grupos experimentais ( $p < 0,05$ ) quando comparada ao grupo RPT. <sup>#</sup> Diferença significativa, quando comparada ao RPT+G+N.

GRUPOS	PESO INICIAL (g)	PESO FINAL (g)	CARCAÇA (g)	PESO TUMOR (g)
RPT	232.01 $\pm$ 10.91	257.70 $\pm$ 11.80	238.04 $\pm$ 14.68	25.75 $\pm$ 1.38
RPT+G+N	202.08 $\pm$ 12.95	238.17 $\pm$ 14.55	226.01 $\pm$ 11.58	14.07 $\pm$ 1.21 <sup>♦</sup>
RPT+G+N+C	201.73 $\pm$ 11.68	252.35 $\pm$ 12.20	241.05 $\pm$ 11.44 <sup>▲</sup>	8.45 $\pm$ 0.73 <sup>♦#</sup>
RPT+G+N+C+I	211.65 $\pm$ 11.04	260.01 $\pm$ 15.72	250.91 $\pm$ 15.02 <sup>▲</sup>	6.99 $\pm$ 0.35 <sup>♦#</sup>

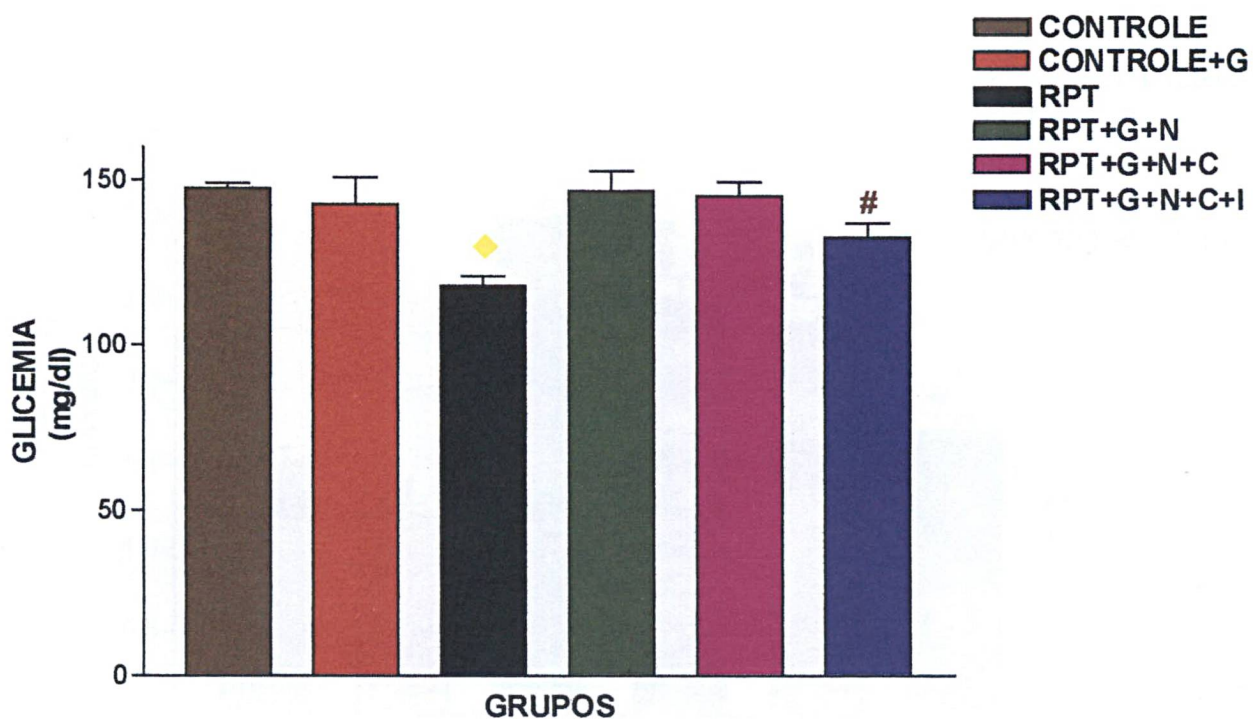


**FIGURA 3:** Peso do coração dos grupos controle (CNT); CNT+ Glutamina (CNT+G); com tumor (RPT) e dos grupos com tumor tratados com Glutamina + Naproxeno (RPT+G+N); Glutamina + Naproxeno + Clenbuterol (RPT+G+N+C); Glutamina + Naproxeno + Clenbuterol + Insulina (RPT+G+N+C+I), após 10 dias de tratamento. Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 10 animais por grupo.

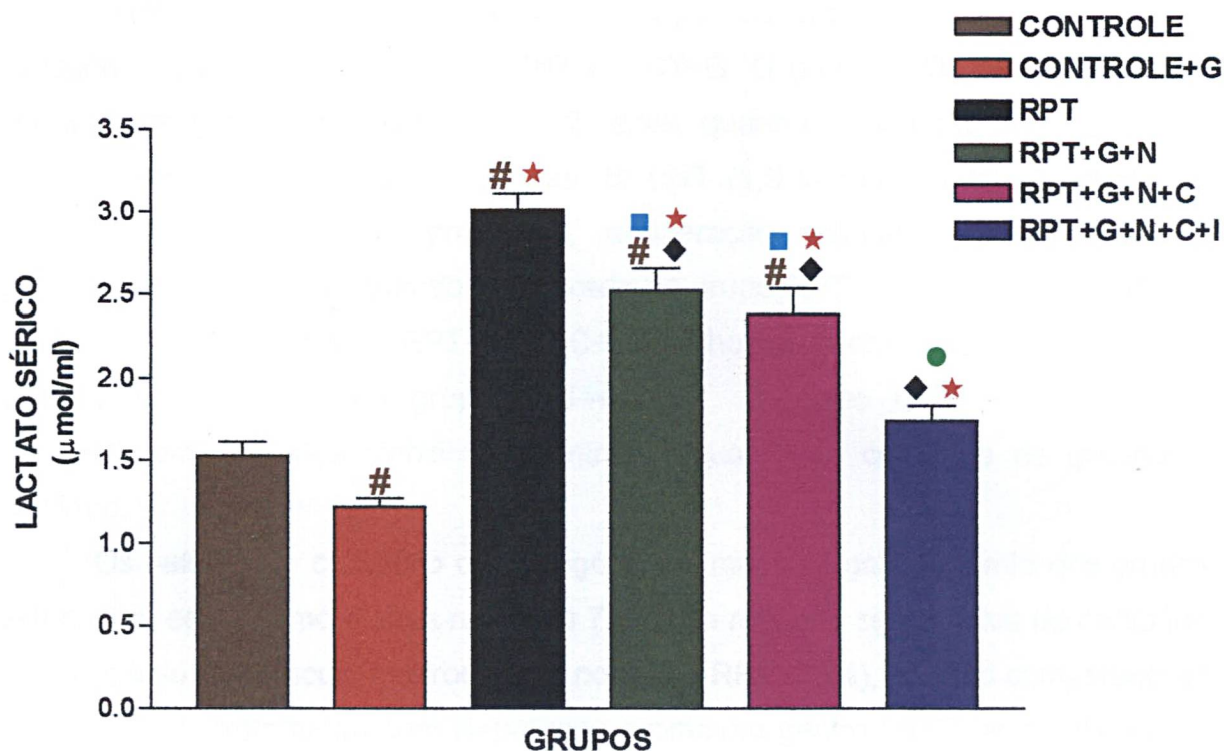
## PARÂMETROS METABÓLICOS DOS GRUPOS PORTADORES DE TUMOR, PORTADORES DE TUMOR TRATADOS E CONTROLE

A figura 4 mostra a glicemia dos grupos estudados. O grupo Portador de tumor (RPT) apresentou diferença significativa da glicemia, quando comparada a todos os demais grupos. O tratamento com Naproxeno e Clenbuterol promoveram a recuperação da glicemia aos valores do grupo (CNT) ( $p < 0,05$ ). No grupo RPT+G+N+C+I houve aumento significativo da glicemia, quando comparado ao grupo RPT, entretanto, não retornou aos valores do CNT ( $p < 0,05$ ).

A figura 5 representa o resultado do lactato sérico dos grupos estudados. O grupo RPT teve o dobro da concentração sérica de lactato quando comparado ao grupo CNT. O tratamento com Naproxeno e Glutamina promoveu redução significativa do lactato sérico, entretanto, ficou 1,6 vezes maior quando comparado ao CNT. A adição de Clenbuterol ao tratamento não modificou este resultado. Por outro lado a adição de Insulina fez com que a concentração sérica de lactato voltasse aos valores do CNT. Um dado interessante foi que, a suplementação com glutamina reduziu o lactato sérico e isto foi significativo quando comparado ao grupo CNT e, conseqüentemente aos demais grupos.



**FIGURA 4:** Glicemia dos animais dos grupos controle (CNT); CNT + Glutamina (CNT+G); com tumor (RPT) e dos com tumor tratados com Glutamina + Naproxeno (RPT+G+N); Glutamina + Naproxeno + Clenbuterol (RPT+G+N+C); Glutamina + Naproxeno + Clenbuterol + Insulina (RPT+G+N+C+I). #Diferença significativa entre o grupo experimental ( $p < 0,05$ ) quando comparada ao grupos CNT. ♦ Diferença significativa entre o grupo experimental ( $p < 0,05$ ) quando comparada a todos os demais grupos. Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 10 animais por grupo.

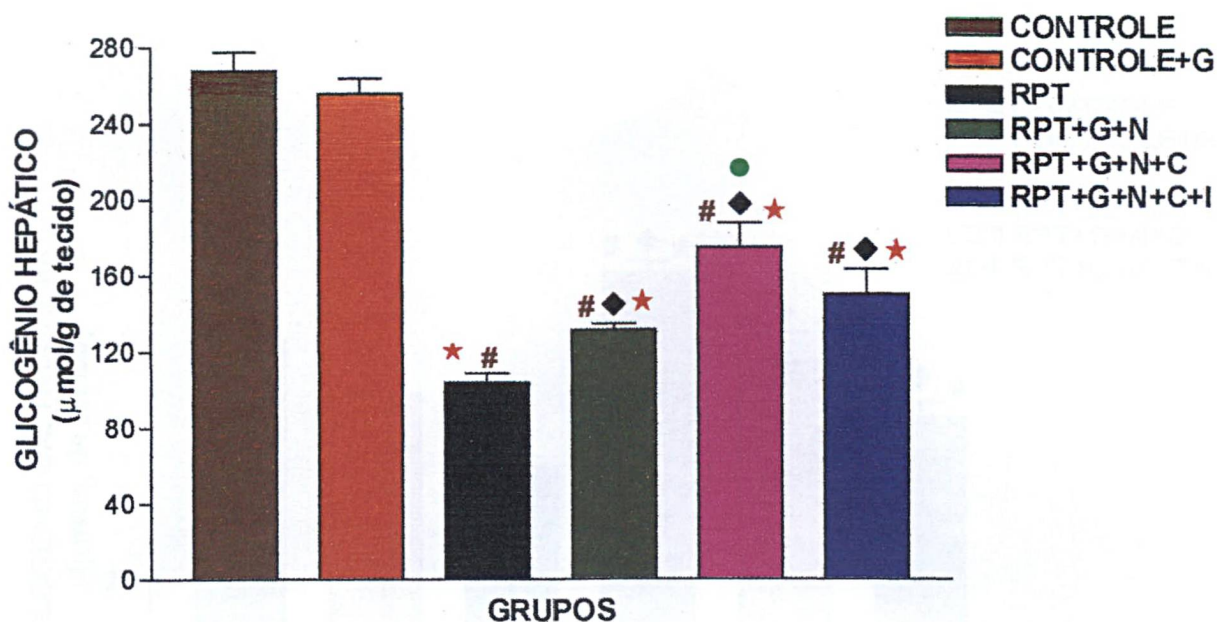


**FIGURA 5:** Lactato sérico dos grupos controle (CNT); CNT + Glutamina (CNT+G); com tumor (RPT) e dos com tumor tratados com Glutamina + Naproxeno (RPT+G+N); Glutamina + Naproxeno + Clenbuterol (RPT+G+N+C); Glutamina + Naproxeno + Clenbuterol + Insulina (RPT+G+N+C+I). # Diferença significativa entre o grupo experimental ( $p < 0,05$ ) quando comparada ao grupo CNT. \* Diferença significativa entre o grupo experimental ( $p < 0,05$ ) quando comparada ao grupo CNT+G. ♦ Diferença significativa entre o grupo experimental ( $p < 0,05$ ) quando comparadas ao grupo RPT. ● Diferença significativa entre o grupo experimental ( $p < 0,05$ ) quando comparada ao grupo RPT+G+N. ■ Diferença significativa entre o grupo experimental ( $p < 0,05$ ) quando comparada ao grupo RPT+G+N+C+I. Os dados representam a média EPM de 10 animais por grupo.

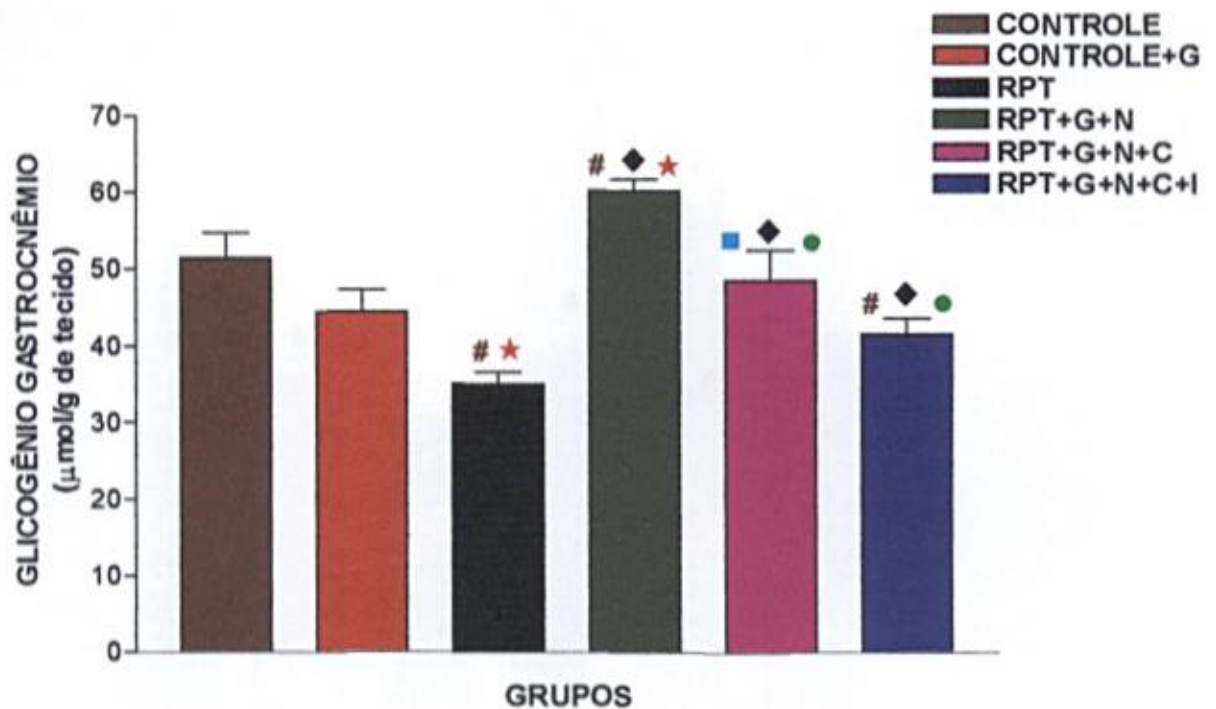
A figura 6 representa os valores do conteúdo de glicogênio hepático dos grupos estudados. O grupo RPT teve redução de 2,5 vezes no conteúdo de glicogênio, quando comparado ao CNT e CNT+G. O grupo RPT+G+N elevou seu conteúdo de glicogênio hepático em 1,2 vezes, quando comparado ao grupo RPT, contudo, continuou aquém dos valores do CNT (1,9 vezes menor). A adição de Clenbuterol ao tratamento promoveu recuperação adicional do conteúdo de glicogênio de 1,6 vezes, quando comparado ao grupo RPT e ficou 1,5 vezes abaixo do grupo CNT. No grupo RPT+G+N+C+I não houve ganho adicional, sendo os valores próximos aos do grupo RPT+G+N+C. O grupo CNT e CNT+G não apresentaram diferença significativa entre si, quanto ao conteúdo de glicogênio hepático.

Os valores do conteúdo de glicogênio do músculo gastrocnêmio dos grupos estudados, estão demonstrados na figura 7. Houve redução significativa do conteúdo de glicogênio do músculo gastrocnêmio no grupo RPT (32%), quando comparado ao grupo CNT. O tratamento com Naproxeno promoveu ganho adicional de glicogênio em músculo gastrocnêmio, sendo significativamente superior aos valores do grupo CNT e CNT+G ( $p < 0,05$ ). No grupo RPT+G+N+C houve recuperação do conteúdo de glicogênio aos valores do CNT, entretanto, ao compararmos com o grupo RPT+G+N não ocorreu ganho significativo. A adição de Insulina ao tratamento induziu a recuperação parcial do conteúdo de glicogênio do músculo gastrocnêmio (23%), quando comparado ao RPT, mas não voltou ao nível dos valores do CNT, ficando 14% abaixo deste. Esse resultado foi significativamente diferente dos resultados encontrados nos grupos CNT, RPT+G+N e RPT+G+N+C.

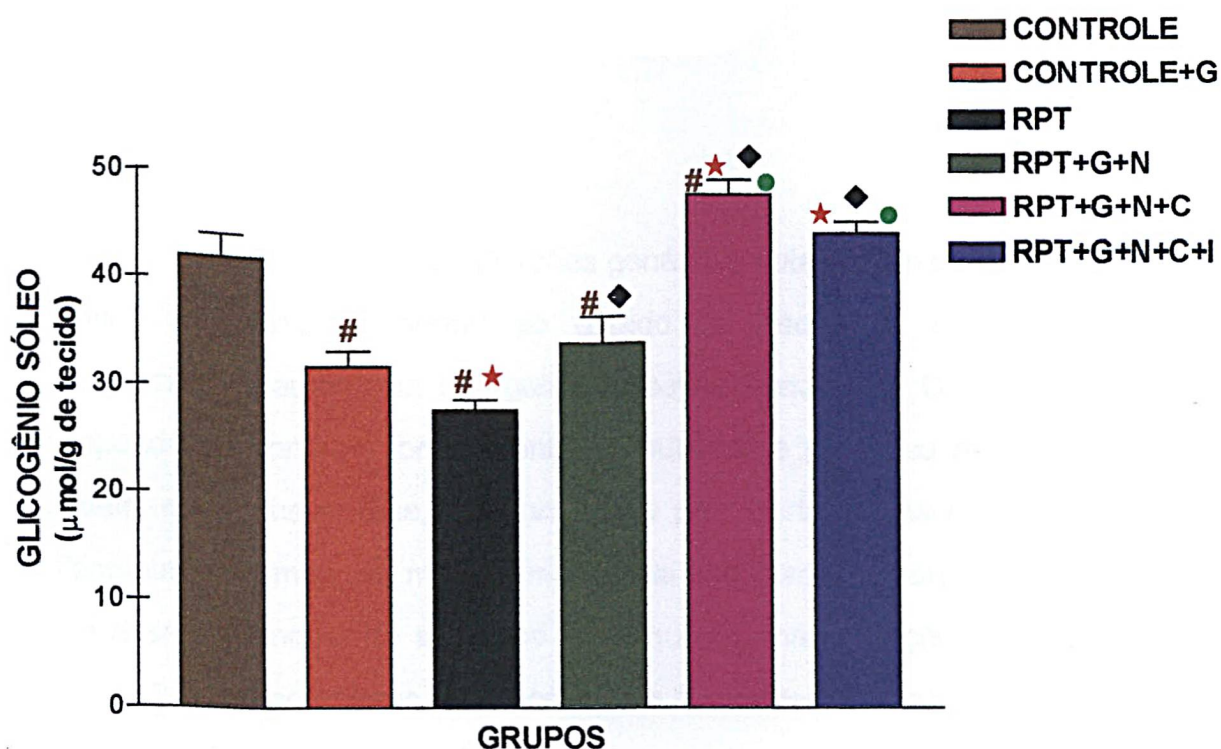
A figura 8 mostra os valores do conteúdo de glicogênio do músculo sóleo dos grupos estudados. O grupo RPT teve seu conteúdo de glicogênio reduzido em 36% neste músculo, quando comparado ao grupo CNT. O tratamento com Naproxeno promoveu recuperação de 16%, quando comparado ao grupo RPT e em relação ao CNT este valor ficou 14% abaixo. No grupo RPT+G+N+C, houve recuperação do conteúdo de glicogênio em músculo sóleo 17% acima do CNT. Ao ser adicionado Insulina ao tratamento, o conteúdo de glicogênio, neste músculo, retorna aos valores do CNT. Interessantemente, o grupo CNT+G apresentou redução significativa do conteúdo de glicogênio ( $p > 0,05$ ), quando comparado ao CNT.



**FIGURA 6:** Conteúdo de glicogênio hepático dos grupos Controle (CNT); CNT + Glutamina (CNT+G); com tumor (RPT) e dos com tumor tratados com Glutamina + Naproxeno (RPT+G+N); Glutamina + Naproxeno + Clenbuterol (RPT+G+N+C); Glutamina + Naproxeno + Clenbuterol + Insulina (RPT+G+N+C+I). # Diferença significativa entre o grupo experimental ( $p < 0,05$ ) quando comparada ao grupo CNT. ♦ Diferença significativa entre o grupo experimental ( $p < 0,05$ ) quando comparada ao grupo RPT. ● Diferença significativa entre o grupo analisado ( $p < 0,05$ ) quando comparada ao grupo RPT+G+N. \* Diferença significativa entre o grupo analisado ( $p < 0,05$ ) quando comparada ao grupo CNT+G. Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 10 animais por grupo.



**FIGURA 7:** Conteúdo de glicogênio do músculo gastrocnêmio dos grupos controle (CNT); CNT + Glutamina (CNT+G); com tumor (RPT) e dos com tumor tratados com Glutamina + Naproxeno (RPT+G+N); Glutamina + Naproxeno + Clenbuterol (RPT+G+N+C); Glutamina + Naproxeno + Clenbuterol + Insulina (RPT+G+N+C+I). #Diferença significativa entre o grupo experimental ( $p < 0,05$ ) quando comparada ao grupo CNT. ♦Diferença significativa entre o grupo experimental ( $p < 0,05$ ) quando comparada ao grupo RPT. ●Diferença significativa entre o grupo analisado ( $p < 0,05$ ) quando comparada ao grupo RPT+G+N. ★Diferença significativa entre o grupo analisado ( $p < 0,05$ ) quando comparada ao grupo CNT+G. ■Diferença significativa entre o grupo analisado ( $p < 0,05$ ) quando comparada ao grupo RPT+G+N+C+I. Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 10 animais por grupo.



**FIGURA 8:** Conteúdo de glicogênio do músculo sóleo dos grupos controle (CNT); controle + Glutamina (CNT+G); com tumor (RPT) e dos com tumor tratados com Glutamina + Naproxeno (RPT+G+N); Glutamina + Naproxeno + Clenbuterol (RPT+G+N+C); Glutamina + Naproxeno + Clenbuterol + Insulina (RPT+G+N+C+I). # Diferença significativa entre os grupos experimentais ( $p < 0,05$ ) quando comparada ao grupo CNT. ♦ Diferença significativa entre o grupo experimental ( $p < 0,05$ ) quando comparada ao grupo RPT. ● Diferença significativa entre o grupo analisado ( $p < 0,05$ ) quando comparada ao grupo RPT+G+N. \* Diferença significativa entre o grupo analisado ( $p < 0,05$ ) quando comparada ao grupo CNT+G. Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 10 animais por grupo.

## DISCUSSÃO

Embora a soma das alterações genéticas determinem as transformações que levam uma célula "normal" ao estado de neoplasia, estas mudanças não proporcionam autonomia energética a célula cancerosa. O crescimento tumoral depende de contínuo fornecimento de substratos para seu alto metabolismo, os quais, em última análise, são fornecidos pelo portador. Assim, o comportamento "egoísta" do tumor, por mecanismos ainda não completamente esclarecidos, induz ao desenvolvimento da síndrome da caquexia, manifestação clínica mais comum em indivíduos portadores de câncer. Esta é caracterizada por perda progressiva de peso corpóreo, intenso catabolismo e anorexia, refletindo o efeito potencialmente letal do tumor sobre o portador (TESSITORE et al., 1994).

A evolução temporal de peso corpóreo dos ratos portadores de tumor de Walker 256 é mostrado na figura 1. Observa-se que ratos portadores de tumor não apresentam ganho de peso significativo neste período, quando comparados ao controle. Isto corrobora dado a literatura sobre catabolismo nos indivíduos com câncer (ARGILÉS et. al., 1997; COSTELLI, 1999; FERNANDES et. al, 1989, 1990; GAGNON e BRUERA , 1998). Após a retirada do tumor, tem-se o peso da carcaça (tabela 1), este dado mostrou que esses animais não apresentaram aumento de peso real, comparado peso final, sendo portanto, o peso do tumor responsável pelo "aparente" ganho de peso corpóreo apresentado por estes animais (figura 1).

A glicose é um dos "combustíveis" mais utilizados pelas células tumorais, para o suprimento de suas necessidades energéticas (WARBURG, 1930), assim como pelas células normais, no entanto, diferem na metabolização deste substrato.

As células normais oxidam completamente a glicose através do ciclo de Krebs, obtendo rendimento energético de 38 ATPs por molécula de glicose, gerando CO<sub>2</sub>, água e um fluxo de piruvato para dentro da mitocôndria, o qual inibe a glicólise e a formação de lactato, mantendo auto-regulado o consumo de glicose na presença de oxigênio (efeito Pasteur). Já nas células tumorais, a glicólise é o principal processo utilizado para a metabolização de glicose, o qual apresenta baixo rendimento energético (2 ATPs por molécula de glicose) e alta produção de lactato, mesmo em condições aeróbicas, o que aumenta o consumo de glicose nessas células (BAGGETO, 1997).

Os valores de glicemia estavam significativamente diminuídos e os de lactato sérico elevados nos animais portadores de tumor, quando comparados ao controle (figura 4 e 5, respectivamente). Esses dados indicam que as células do tumor de Walker 256 estão consumindo glicose e produzindo lactato em altas taxas, o qual estimula a gliconeogênese hepática na tentativa de manter os níveis normais de glicose plasmática (SINGH et. al., 1980, 1997; SAKURAI, 1998). Isto é corroborado pelos dados da figura 6, onde tem-se redução de 64% no conteúdo de glicogênio hepático no grupo RPT, quando comparado ao grupo controle. O tumor neste grupo correspondeu a 10% do peso corpóreo (figura 1 e tabela 1).

O catabolismo intenso, apresentados pelos ratos portadores de tumor de Walker 256, é resultado da concentração reduzida de insulina encontrada nestes animais (FERNANDES et. al., 1990; ) e das concentrações elevadas de hormônios contrareguladores, tais como, glucagon, cortisol e catecolaminas (ARGILÉS et al., 1997; COSTELLI et. al., 1999; TRACEY et. al., 1987), associada à produção de citocinas (TNF, IL<sub>6</sub>) pelas células do sistema imune (ARGILÉS et. al., 1999) e pela alta produção de PGE<sub>2</sub> nas células tumorais e tecidos periféricos do hospedeiro (SIDDIQUI and WILLIAMS, 1987). Isto explicaria a perda de peso acentuada nos RPT (figura 1), assim como a diminuição dos estoques energéticos, tais como, o conteúdo de glicogênio hepático e muscular (figuras 6, 7 e 8, respectivamente). Assim, o organismo hospedeiro para manter-se vivo, lança mão de suas reservas

de energia a fim tentar de manter a glicemia, através da glicogenólise e gliconeogênese, entretanto a glicose produzida, é utilizada pelo tumor, demonstrado pelo aumento da concentração de lactato circulante (figura 5). Isto ocorre também porque, as células do tumor de Walker 256 são insulino-independentes quanto à captação e metabolização de glicose (FERNANDES et. al., 1990).

Outro importante aspecto que contribui para o catabolismo muscular na caquexia, é o ávido consumo de glutamina pelos tumores de crescimento rápido, como o tumor de Walker 256 (MEDINA et. al., 1992; NEWSHOLME et. al., 1988,1989; PARRY-BILLINGS et. al., 1991; SOUBA, 1993). PEARLSTONE et. al. (1995) mostraram que a eficácia das terapias dirigidas às perturbações metabólicas dependem de suporte nutricional e, principalmente, da manutenção dos níveis adequados de aminoácidos circulantes no organismo portador de tumor. De fato, a glutamina por si só não apresentou efeitos anabólicos. Animais normais que receberam suplementação oral de glutamina por 14 dias não apresentaram ganho adicional de peso corpóreo, quando comparados aos controles (figura 1). Assim, talvez a suplementação apenas com glutamina não permita a recuperação do quadro metabólico. No entanto, sua associação a vários outros aminoácidos na reversão do quadro caquético ainda deve ser estudado.

O uso de inibidores da síntese de  $PGE_2$  tem sido mostrado ser eficaz na reversão do quadro caquético em ratos portadores de tumor de Walker 256 (HOMEM-DE-BITTENCOURT et. al., 1989) e, em animais portadores de leucemia (ROE et. al., 1997). O Naproxeno, antiinflamatório não esteróide, utilizado no tratamento de processos reumáticos e neoplásicos, devido a sua baixa incidência de efeitos colaterais (JOHNSON et. al., 1996; LIAW et. al., 1998), foi mostrado ser capaz de reduzir o catabolismo muscular e a massa tumoral em indivíduos portadores de tumor de YOSHIDA (AH-130), potente secretor de  $PGE_2$  (STRELKOV et. al., (1989).

De fato a administração de 0,10 mg/ml de Naproxeno em ratos portadores de tumor de Walker 256 produziu redução da taxa de crescimento tumoral de aproximadamente 50% (PIFFAR, 1999).

Como mostrado na figura 2, a associação de suplementação oral com glutamina ao tratamento com naproxeno produziu redução da taxa de crescimento tumoral de 45,3% nos ratos portadores de tumor de Walker 256, quando comparados ao grupo RPT. Ao compararmos este resultado com estudo anterior (PIFFAR, 1999), podemos inferir que a suplementação com glutamina não provocou efeito adicional na redução da velocidade de crescimento tumoral. Sendo assim, portanto, o Naproxeno responsável por este efeito.

Os resultados apresentados na figura 7, no entanto, parecem condizentes com a hipótese de PEARLSTONE et. al. (1995), pois o grupo RPT tratados com naproxeno e suplementação oral de glutamina apresentaram ganho adicional no conteúdo de glicogênio do músculo gastrocnêmio de 17%, quando comparados ao CNT e de 72,4% quando comparado ao grupo RPT. Este resultado corrobora os estudos realizados por STRELKOV et. al., (1989) e HOMEM-DE-BITTENCOURT et. al., (1989) que mostraram a redução do catabolismo proteico por derivados do ácido propiônico, em tumores com alta produção de PGE<sub>2</sub>. Enquanto a suplementação com glutamina, poderia estar reduzindo o efluxo deste aminoácido do músculo esquelético, devido a redução dos seus níveis plasmáticos, como demonstrado por PARRY-BILLINGS et. al., (1991). De fato, ao compararmos este resultado com estudo anterior (PIFFAR, 1999), o tratamento de ratos portadores de W256 com naproxeno, sem suplementação com glutamina, não produziu ganho adicional no conteúdo de glicogênio do músculo gastrocnêmio quando comparados ao controle, significando que a glutamina, por mecanismos ainda não estudados, poderia beneficiar a deposição dos estoques de carboidratos nestes animais.

Apesar do efeito benéfico da combinação de naproxeno com glutamina em músculo gastrocnêmio, não houve melhora significativa no ganho de peso corpóreo (figura 1).

Contudo, a melhora significativa do conteúdo de glicogênio hepático, neste grupo em relação aos RPT (figura 6), mostrou reversão parcial da caquexia nestes animais, uma vez que o glicogênio hepático é que participa na manutenção da glicemia e não o muscular.

O Clenbuterol, utilizado como broncodilatador, é agonista  $\beta_2$ -adrenérgico com ação específica também em músculo estriado. Observou-se que a atrofia induzida pela denervação do músculo esquelético foi evitada pela administração de Clenbuterol, devido ao aumento da síntese proteica muscular (MALTIN et. al., 1987a, 1987b). Foi sugerido ainda que o Clenbuterol mimetiza ou estimula a produção de fatores neurotróficos, os quais podem atuar na regulação gênica da fibra muscular (MALTIN et. al., 1993). Isto talvez pelo fato deste agente ser solúvel em lipídios (SAUX et. al., 1986), e ser um dos poucos agonista  $\beta_2$ -adrenérgicos que atravessam a barreira hematoencefálica (GEYER e FRAMPTON, 1988). Por outro lado, outros estudos mostraram o Clenbuterol como potente agente proteogênico, sugerindo que seu mecanismo de ação esteja associado à ativação de receptor  $\beta_2$ -adrenérgico seletivo (ICI 11118551), o qual promove o crescimento muscular (MORTON et. al., 1995; BAKKER et. al., 1998), por regulação da expressão de fatores miogênicos (DELDAY et. al., 1997).

Experimento realizado com ratos Wistar saudáveis demonstrou que o uso de Clenbuterol aumentou a proporção de tecido muscular (razão massa muscular/massa corporal), produziu aumento de peso e maior aproveitamento de nutrientes, efeitos estes dependentes da dose de Clenbuterol administrada e, principalmente, foram diretamente proporcionais ao conteúdo de proteínas existente na dieta (PEREZ et. al., 1991).

O efeito anabólico dos agentes agonista  $\beta_2$ -adrenérgicos, tem sido demonstrado eficiente na reversão de diversas situações catabólicas, onde há predominância da degradação de proteínas como, distrofia muscular, trauma e a caquexia induzida pelo câncer, porém os mecanismos de ação destes agentes, não estão completamente esclarecidos (BAKKER et. al., 1998; GAGNON e BRUERA, 1998; MARTIN et. al., 1986; MORTON et. al., 1995; REEDS et. al., 1986; STALLION et. al., 1991, 1993; SUZUKI et. al., 1998; YANG et. al., 1989).

A adição de Clenbuterol ao tratamento com naproxeno e suplementação oral com glutamina nos RPT de Walker 256 (fig. 7), promoveu recuperação do conteúdo de glicogênio do músculo gastrocnêmio aos valores do controle. Na figura 8, um ganho adicional de 14% no conteúdo de glicogênio do músculo sóleo nos RPT tratados com Naproxeno + Clenbuterol + suplementação oral de glutamina, quando comparados ao grupo controle e de 71,5%, quando comparados aos RPT. Isto poderia ser causado pelo efeito proteogênico do clenbuterol promovendo crescimento muscular (BAKKER et. al., 1998; DELDAY et. al., 1997; MORTON et. al., 1995), apoiado pela suplementação com glutamina que fornece quantidade de substrato adequado para o anabolismo muscular (INOUE et. al., 1995; KLIMBERG et. al., 1990), principalmente, em músculo vermelho, o qual possui níveis mais elevados de glutamina, talvez pela predominância de fibras oxidativas neste músculo (CURI, 2000). De fato, STALLION et.al.(1993) sugerem que o uso dos agonistas  $\beta_2$ -adrenérgicos associado à suplementação nutricional permitem ao hospedeiro melhor aproveitamento dos nutrientes, o qual ocorre preferencialmente no tecido muscular. No entanto, ao compararmos este resultado com estudo anterior (PIFFAR, 1999), este ganho adicional no conteúdo de glicogênio do músculo sóleo ocorreu mesmo na ausência de suplementação com glutamina.

Como mostrado na tabela 1, a adição de Clenbuterol ao tratamento com Naproxeno e suplementação de glutamina em ratos portadores de tumor de Walker 256 promoveu ganho de peso corpóreo, quando comparados peso inicial e peso da carcaça. Provavelmente, ocasionado pelo efeito proteogênico do Clenbuterol diminuindo a perda de massa muscular.

De fato, a administração de Clenbuterol em ratos portadores de AH-130 reduziu a elevada taxa de oxidação de aminoácidos de cadeia ramificada (leucina), nos tecidos periféricos desses animais, protegendo a perda de massa muscular e evitando a redução do peso corpóreo (COSTELLI et al., 1995). Além disso, o Clenbuterol é citado como agente inibidor da produção de TNF e IL-1 em macrófagos e linfócitos, podendo reduzir os efeitos catabólicos dessas citocinas (YOSHIMURA et al., 1997), minimizando a perda de peso em indivíduos portadores de tumor.

Como podemos observar na figura 2, houve redução significativa na taxa de crescimento tumoral nos ratos portadores de tumor que receberam adição de Clenbuterol ao tratamento, quando comparados ao grupo RPT+G+N e aos RPT. O peso do tumor representou 3,4% do peso corpóreo nos RPT+G+N+C, 5,9% nos RPT+G+N e 10% nos RPT. Este resultado é condizente com a hipótese de apoio nutricional no paciente de câncer, apesar de controverso, pode ser considerado eficaz no combate à caquexia, quando farmacologicamente adequado (ALBRECHT, 1996). Podemos sugerir ainda que, o uso combinado de naproxeno e clenbuterol produziria efeito antagônico ao produzido pelo tumor, como a produção de citocinas e o catabolismo muscular (YOSHIMURA et al., 1997), enquanto que a suplementação com glutamina talvez estaria suprindo a demanda deste aminoácido para as células do sistema imune, melhorando as condições gerais do hospedeiro para combater o tumor. Esta hipótese é plausível e deveria ser testada.

GAGIG et al., (1997) demonstraram que ratos portadores de tumor de Walker 256 tratados com Clenbuterol tiveram redução na taxa de crescimento

tumoral e da anemia induzida pelo tumor (aumento do hematócrito), quando comparados aos ratos portadores de tumor não tratados. Sugeriram que o tratamento com Clenbuterol possa reduzir a inibição da hematopoiese induzida pelo tumor de Walker 256, aumentando a "imunovigilância" do hospedeiro, o que resulta na supressão tumoral.

Apesar de alguns estudos comprovarem que a administração de Clenbuterol induz a hipertrofia cardíaca (CARBÓ et. al., 1997), este efeito não foi observado em nosso trabalho. Como mostra a figura 3, não houve alteração da massa cardíaca nos RPT tratados com clenbuterol (0,15 mg/kg p.c.), quando comparados ao controle. STALLION et. al. (1993) comprovaram que a administração diária de até 0,30 mg/kg p.c de clenbuterol produz melhora do conteúdo de proteínas em músculo esquelético, sem induzir à hipertrofia cardíaca. Outros estudos demonstraram que o Clenbuterol induz a uma hipertrofia cardíaca com aspectos funcionais, morfológicos e moleculares normais, sem prejuízo cardiovascular (WONG et. al., 1998).

Como mostrado na figura 5, ocorreu redução de 17% nos níveis de lactato sérico no grupo RPT+G+N+C, quando comparados ao grupo RPT. Provavelmente, devido a diminuição na taxa de crescimento do tumor, ocasionado pelos efeitos produzidos pelo Naproxeno e Clenbuterol (figura 2). Ocorreu também, recuperação significativa no conteúdo de glicogênio hepático (figura 6), quando comparados ao grupo RPT+G+N e ao grupo RPT. Isto poderia ser resultado da suplementação oral de glutamina, aumentando o suprimento de substrato para a gliconeogênese hepática, diminuindo a perda de glicogênio no fígado. Este resultado não foi observado quando, ratos portadores de tumor de Walker 256 foram tratados com Naproxeno e Clenbuterol sem suplementação de glutamina (PIFFAR, 1999).

INOUE et. al. (1995) demonstraram a habilidade do suporte nutricional na regulação do sistema de transporte de glutamina no fígado, sugerindo que a utilização de dieta enriquecida com glutamina no tratamento de indivíduos

portadores de câncer poderia manter os níveis de glutamina hepática e, conseqüentemente, prevenir a liberação deste aminoácido pelo músculo do hospedeiro.

A insulina é o principal hormônio anabólico do metabolismo intermediário, sua presença é indispensável para a utilização de glicose por aproximadamente 60% dos tecidos corporais. Além do seu papel primário de controlar o transporte e utilização de glicose pelas células, este hormônio estimula ainda a síntese de glicogênio, proteínas e lipídios em músculos e tecido adiposo. Atua também sinergicamente com vários fatores de crescimento e, *in vitro* apresenta efeitos estimulatórios sobre o crescimento celular (FERNANDES et al., 1989; 1996; STRAUS, 1984; WILLIAMS et al., 1992). No fígado, este hormônio aumenta a síntese de glicogênio (HALFT, 1968), inibe a degradação de proteínas em músculo esquelético (MANCHESTER, 1970; KRAHL, 1972; GOLBERG, 1978; MARONI et al, 1986) e a lipólise em tecido adiposo (BROWSEY e DENTON, 1985). Estudo das ilhotas pancreáticas isoladas de ratos portadores de tumor de Walker 256 comprovou haver diminuição na secreção de insulina frente ao estímulo com glicose, o que pode explicar a hipoinsulinemia observada nestes animais (FERNANDES et al., 1991). Animais portadores do tumor de Walker 256, quando tratados apenas com este hormônio (4U/100g.p.c.) reverteram a caquexia e reduziram a velocidade de crescimento tumoral, possivelmente por diminuir a oferta de substratos essenciais para o crescimento tumoral (FERNANDES, 1990; MEDINA et al., 1992; NEWSHOLME et al, 1988). Seus efeitos sobre o metabolismo de glicose, lipídios e proteínas são opostos aos gerados pela presença do tumor (FERNANDES et al., 1996), minimizando a degradação de lipídios e a perda de massa muscular em indivíduos portadores de tumor (COSTELLI, 1999; PEARLSTONE, 1994). Seu efeito é potente na musculatura esquelética, pois esta

apresenta maior quantidade de uma das isoformas de proteína transportadora de glicose (GLUT4), a qual tem sua atividade aumentada pela insulina e, conseqüentemente maior captação de glicose (BURANT et. al., 1991; FERNANDES et. al., 1996).

A adição de insulina em dias alternados em doses de 1U/100g p.c., associada ao Naproxeno, Clenbuterol e suplementação oral de glutamina em ratos portadores de tumor de Walker 256 não produziu resultado significativo adicional na reversão do quadro caquético, quando comparado ao resultado obtido no grupo RPT+G+N+C. A explicação para este fato talvez esteja no protocolo experimental utilizado, com o objetivo de reduzir o risco de hipoglicemia, onde a insulina foi administrada em dias alternados e em dose menor que a utilizada em estudos prévios (FERNANDES et.al., 1990). Nós aventamos a hipótese de que se as injeções passassem a ser diárias, teríamos um efeito somatório aos resultados obtidos pelo tratamento com Naproxeno e Clenbuterol, juntamente com a suplementação com glutamina. Esta hipótese, entretanto, deve ser testada.

## CONCLUSÕES

Nossos resultados mostram que o tratamento com Naproxeno, Clenbuterol, Insulina e suplementação oral com Glutamina promoveu reversão parcial da caquexia em ratos portadores de W256. Adição de glutamina não estimulou a taxa de crescimento tumoral. O Naproxeno é o principal agente responsável pela redução na velocidade de crescimento tumoral.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGGARWAL, B.B. and NATARAJAN, K. Tumor necrosis factors: developments during the last decade. **Eur. Ciytokine Netw.**, 7,93, 1996.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. **Biologia Molecular da Célula**, 3 ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1299p, 1997.

ALBRECHT, J.T. Cachexia and anorexia in malignancy. **Hematol. Oncol. Clin. North. Am.** 10(4):791-800, 1996.

ARDAWI, M.S.M. Glutamine syntesizing activity lung of fed, starved, acidotic, diabetic, injured and septic rats. **Biochem. J.**, 270:829-32, 1990.

ARGILES, J.M. ; ALVAREZ, B.; LOPES-SORIANO, F.J. The metabolism basis of cancer cachexia. **Med. Res. Rer.**, 17(5):477-98, 1997.

ARGILÉS, J.M.; AZCÓN-BIETO, J. The metabolic environment of cancer. **Mol. Cell. Biochem.**, **81**:3-17, 1988.

ARGILES, J.M.; COSTELLI, P.; CARBO, N.; PALLARES-TRUJILLO, J.; LOPES-SORIANO, F.J. Tumor growth and nitrogen metabolism in host. **Inst. J. oncol.**, **14**(3):479-86, 1999.

ARGILÉS, J.M. and LÓPEZ-SORIANO, F.J. Oxidation of branched-chain amino acids in tumour-bearing rats. **Biochem. J.**, **268**:241, 1990.

BAKKER, A.J.; HEAD, S.I.; WAREHAM, A.C.; STEPHENSON, G. Effect of clenbuterol on sarcolemmal reticulum function in single skinned mammalian skeletal muscle fibers. **Am. J. Physiol.** **274**, **43**:C1718-28, 1998.

BARACOS, V.; ROEDEMAN, H.P.; DINARELLO, C. A.; GOLDBERG, A. L. Stimulation of muscle protein degradation and prostaglandin E<sub>2</sub> release by leukocytic pyrogen: A mechanism for the increased degradation of muscle proteins during fever. **N. Engl. J. Med.**, **308**:553-8, 1983.

BARAI, B; DeWys,W; Assay for presence of anorexic substance in urine of cancer patients. **Proc Am. Assoc. Cancer Res.**, **21**:378, 1980.

BEISEL, W.R. Metabolic response to infection. **Ann. Rev. Med.**, **26**:9-20, 1975.

BEUTLER, B.; GREENWALD, D.; HULMES, J.D.; CHANG, M.; PAN, Y.C.E.; MATHISON, J.; ULEVITCH and CERAMI, A. Identity of factor and macrophage-secreted factor cachectin. *Nature*, 316:552-54, 1985.

BRAND, R. Glutamine and glucose metabolism during thymocytes proliferation. **Biochem. J.**, **228**:353-61, 1985.

BROWNSEY, R.W. & DENTON, R.M. In: **Molecular basis of insulin action**. Ed. M. P. Czech. New York, Plenum Press, 1985. P. 297-314.

BURANT, C.F.; SIVITZ, W.I.; FUKUMOTO, H; KAYANO, T.; NAGAMATSU, S.; SEINO, S.; PESSIN, J.E. and BELL, G.I. Mammalian glucose transporters: Structure and molecular regulation. **Rec. Progr. Horm. Res.**, **47**:349-88, 1991.

CAHILL, W.M.; DUNNING, W.F. and SMITH, A. H. A free choice dietary study of tumor-bearing rats. **Cancer research**, **3**:830-2, 1943.

CARBÓ, N.; COSTELLI, P.; TESSITORE, L.; BAGBY, G.J.; LÓPEZ-SORIANO, F.J.; BACCINO, F.M.; ARGILÉS, J.M. Anti-tumour necrosis factor-alpha treatment interferes with changes in lipid metabolism in a tumour cachexia model. *Clin. Sci. (Colch)*, **87(3)**:349-55, 1994.

CARBÓ, N.; LÓPEZ-SORIANO, J.; TARRAGO, T.; GONZALEZ, O.; LIOVERA, M.; LÓPEZ-SORIANO, F.J.; ARGILÉS, J.M. Comparative effects of beta 2-adrenergic agonists on muscle waste associated with tumor growth. *Cancer Lett.*, **115(1)**:113-8, 1997.

CERSINIMO, E.; PISTERS, P.W.T.; PESOLA, G.; ROGATKO, A.; VYDELINGUM, N.A.; BAJORUNAS, D.; BRENNAN, M.F. The effect of insulin on peripheral glucose uptake and lactate release in cancer cachexia. *Surgery*, **109**:459-67, 1997.

CHANCE, W.T.; ZHANG, X.; ZUO, L.; BALASUBRAMANIAM, A. Reduction of gut hypoplasia and cachexia in tumor-bearing rats maintained on total parenteral nutrition and treated with peptide YY and clenbuterol. *Nutrition*, **14(6)**:502-7, 1998.

CHEN, M.K.; ESPAT, N.J.; BLAND, K.I.; COPELAND, E.M.; SOUBA, W.W. Influence of progressive tumor growth on glutamine metabolism in skeletal muscle and kidney. *Ann. Surg.*, **217(6)**:655-66, 1993.

CHLEBOWSKI, R.T.; BULCAVAGE, L.; GROSVENOR, M.; OKTAY, E.; BLOCK, J.B.; CHLEBOWSKI, J.; ALI, I.; ELASHOFF, R. Hydrazine sulfate induces

nutritional status and survival in non-small-cell lung cancer. **J. Clin. Oncol.**, **8(1)**:9-15, 1990.

CHRISTENSEN, H.N. Role of amino acid transport and counter-transport in nutrition and metabolism. **Physiol. Ver.**, **70**:43-77, 1990.

COSTELLI, P.; GARCIA-MARTINEZ, C.; LIOVERA, M.; CARBÓ, N. LÓPEZ-SORIANO, F.J.; AGELL,N.; TESSITORE, L.; BACCINO, F.M.; ARGILÉS, J.M. Muscle protein waste in tumor-bearing rats is effectively antagonized by a beta 2-adrenergic agonist (clenbuterol). Role of the ATP-ubiquitin-dependent proteolytic pathway. **J. Clin. Invest.**, **95(5)**:2367-72, 1995.

COSTELLI, P.; LIOVERA, M.; CARBÓ, N.; GARCIA-MARTINEZ, C.; LÓPEZ-SORIANO, F.J.; ARGILÉS, J.M. Interleukin-1 receptor antagonist (IL-1) is unable to reverse cachexia in rats bearing na ascites hepatoma (Yoshida AH-130). **Cancer Lett.**, **95**:33-8, 1995.

COSTELLI, P.; LIOVERA, M.; GARCIA-MARTINEZ, C.; CARBÓ, N.; LÓPEZ-SORIANO, F.J.; ARGILÉS, J.M. Enhanced leucine oxidation in rats bearing and ascites hepatoma (YOSHIDA AH-130) and its revesal by clenbuterol. **Cancer Lett.**, **91(1)**:73-8, 1995.

COSTELLI, P.; TESSITORE, L.; BATETTA, B; MULAS, M.F.; SPANO, O; PANI,P.; BACCINO, F.M.; DESSI, S. Alterations of lipid and cholesterol metabolism in cachectic tumor-bearing rats are prevented by insulin. **J. Nutr.**, **129(3)**:700-6, 1999.

CURI, R. **Glutamina: metabolismo e aplicações clínicas e no esporte**. Rio de Janeiro: Sprint, 261p., 2000.

CURI, R. Does PECK play a key role for amino acid oxidation? **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 21:70-3, 1988.

CURI, T.C.; DE MELO, M.P.; DE AZEREDO, R.B.; ZORN, T.M.; CURI, R. Glutamine utilization by rats neutrophils: presence of phosphate-dependent glutaminase. **Am. J. Physiol.**, 273:C1124-9, 1997.

CURI, R.; KOWLCHUK, J.M.; NEWSHOLME, E.A. Glutamine metabolism in white adipocytes incubated in vitro. **Biochem. Soc. Trans.**, 15:1071, 1987.

CURTHOYS, N.P.; WATFORD, M. Regulation of glutaminase activity and glutamine metabolism. **Annu. Rev. Nutr.**, 15:133-59, 1995.

DAYER, J.M.; BEUTLER, B.; CERAMI, A. Cachectin/Tumor Necrosis Factor stimulates collagenase and prostaglandin E<sub>2</sub> production by human synovial cells and dermal fibroblasts. **J. Exp. Med.**, 162:2163-8, 1985.

DELDAY, M.I.; MALTIN, C.A. Clenbuterol increases the expression of myogenin but not myo D in immobilized rat muscles. **Am. J. Physiol.**, **272**:E941-4, 1997.

DEMETRAKOPOULOS, G.E.; BRENNAN, M.F. Tumoricidal potential of nutrition of nutritional manipulations. **Cancer Res.**, **42**:756S-655, 1982.

DE WYS, W.D. Management of cancer cachexia. **Semin. Oncol.**, **12**:452, 1985.

DOHENY, M.H.; TIMBRELL, J.A. The effect of clenbuterol on taurine in the heart: Studies in vivo and in vitro. **Amino Acid.**, **13(1)**:88, 1997.

EARLE, W.R. A study of the Walker rat mammary carcinoma 256 in vivo and in vitro. **Am. J. Cancer**, **24**:566-612, 1935.

EDEN, E.; EDSTROM, S; BENNEGARD, K.;SCHERSTEN, T.; LUNDHOLM. Glucose flux in relation to energy expenditure in malnourished in patients with and without cancer during periods of fasting and feeding. **Cancer Res.**, **44**:1718, 1984.

EISEN, M.J. Transplantable carcinoma of the rat breast. **Am. J. Cancer**, **39**:36-44, 1940.

ENGLE & JONES, J. B. Causes and elimination of erratic blanks in enzymatic metabolite assays involving the use of NAD in alkaline Hydrazine buffers: improved

conditions of L-Glutamate, L-Lactate, and other metabolites. **Ann. Biochem.**, **88**:475-84, 1978.

EVANS, W.K.; MAKUCH, R.; CLAMON, G.H.; FELD, R.; WEINER, R.S.; MORAN, E.; BLUM, R.; SHEPHERD, F.A.; JEEBHOY, K.N.; DEWYS, W.D. Limited impact of total parenteral nutrition on nutritional status during treatment for small cell lung cancer **Cancer Res.**, **45**:3347, 1985.

FERNANDES, L.C.; CARPINELLI, A.R.; HELL, N.S.; CURI, R. Improvement of cancer and decrease of Walker 256 tumor growth by insulin administration in rats. **Cancer Therapy and Control**, **1**:259-68, 1991.

FERNANDES, L.C.; MATTOZO, C.A.; MACHADO, U.F.; ROSA, L.F.; CURI, R. Insulin treatment can abolish changes in glucose and glutamine metabolism of lymphocytes and macrophages caused by the implantation of the Walker 256 tumor. **Cell. Biochem. Funct.**, **14(3)**:187-92, 1996.

FERNANDES, L.C.; MACHADO, U.F.; NOGUEIRA, C.R.; CARPINELLI, A.R.; CURI, R. Insulin secretion in Walker 256 tumor cachexia. **Am. J. Physiol.**, **258(6Pt1)**:E1033-6, 1990.

FERNANDES, L.C.; NOGUEIRA, C.R.; MACHADO, U.F.; CARPINELLI, A.R. and CURI, R. Insulin secretion by isolated islets from Walker 256 tumor-bearing rats. **Am. J. Physiol.** (in press), 1989.

FISCHER, J.E. and CHANCE, W.T. Total parenteral nutrition, glutamine, and tumor growth. **J.P.E.N.**, **14**:86S-89S, 1990.

GAGIG, K.; CAMPAGNARO, E.; LABOR DE, C.J. EDAVETTAL, M; LEVINEEA; POTTER, B.J. BURNS, R.L.A.; BURNS A.H. The effect of clenbuterol and recombinant erithopoetin on tumor growth and anemia caused by Walker carcinosarcoma. **Life Sci.**, **61(25)**:2475-84, 1997.

GAGNON, B ; BRUERA, E. A review of the drug treatment of cachexia associated with cancer. **Drugs**, **55(5)**:675-88, 1998.

GEYER, M.A., and S.F. FRAMPTON. Peripheral mediation of effects of clenbuterol on locomotor and investigatory behavior in rats. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, **30**:417-20, 1988.

GIACOSA, I.; FRASCIO, F. ; SUKKAR, S.G. ; RONCELLA, S. Food intake and body composition in cancer cachexia. **Nutrition**, **12**:S20-3, 1996.

GOLD, J. Cancer cachexia and gluconeogenesis. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, **230**:103-10, 1974.

GOLDBERG, A.L. Influence of insulin and contractile activity on muscle size and protein balance. **Diabetes**, **28**:(suppl.1), 1979.

GUAITANI, A; TORRE, P.D. ; MORASKA, L.; PINTUS, C.; BARTOSCK, I. Two lines of Walker carcinoma 256: their peculiarities and different interactions with the host. **Tumori**, **69**:1-9, 1983.

GREENSTEIN, J.P. Biochemistry of cancer. New York, **Academic Press**, p.6, 1954.

HAFT, D.E. Effects of insulin on metabolism of perfused liver of rats made acutely diabetic by anti-insulin serum injection. **Diabetes**, **17**:251-55, 1968.

HARPER, A. E. In: **HUNGER: basic mechanisms and clinical implications**. Ed. D. Novin, W. Wyrwicka & G. Bray. New York, Raven Press, p.103-13, 1976.

HASLETT, P.A. Anticytokines approaches to the treatment of anorexia and cachexia. **Semin. Oncol.**, **25**:53-7, 1998.

HEBER, D.; BYERLY, C.O.; CHLEBOWSKI, R.T. Medical abnormalities in the cancer patient. **Cancer**, **55**:225-9, 1985.

HARVEY, K.B. ; BOTHE, A. and BLACKBURN. Nutritional assessment and patient outcome during oncological therapy. **Cancer**, **43**:2065-9, 1979.

HOLDEN, R.J.; PAKULA, I.S. The role of tumor necrosis factor-alpha in the pathogenesis of anorexia and bulimia nervosa, cancer cachexia and obesity. **Med. Hypotheses**, **47(6)**:423-38, 1996.

HOMEM-DE-BITTENCOURT Jr., P.I.; PONTIERI,V.; CURI, R.; LOPES, O.U. Effects of aspirin-like drugs on Walker 256 tumor growth and cachexia in rats. **Brasilian J. Med. Biol. Res.**, **22**:1039-42, 1989.

HORIG, H.; SCHRODER, M.T.; SCHAFER, G.; SCHAUDER, P. Comparasion between transport and degadation of leucine and glutamine by peripheral human linphocytes exposed to concanavalin A. **J. Cell Physiol.**, **116**:372-8, 1990.

IMAGAWA, W.; BANDYOPADHYAY, G.; WALLACE, D., and NADI, S. Phospholipids containig polyunsaturated fatty acidyl groups are mitogenic normal mouse mammary epithelial cells in serum-free primary cell culture. **Acad. Sci. USA**, **86**:4122, 1989.

INOUE, Y.;BODE, B.P.; SOUBA, W.W. Dietary regulation of the hepatic system N glutamine transport in tumor-bearing rats. **Am. J. Surg.**, **169(1)**:173-8, 1995.

JOHNSTONE, R.M.; SCHOLEFIELD, P.G. Amino acid transport in tumor cells. **Adv. Cancer Res.**, **9**:143, 1982.

KLIMBERG, V.S.; KORNBLUTH, J.; BLOSSOM, S. SCHAFFER, R.F. Glutamine suppress PGE<sub>2</sub> synthesis and breast cancer growth. **J Surg. Res.**, **63**:293-7, 1996.

KLIMBERG, V.S.; SOUBA, W.W.; SALLOUM, R.M.; PLUMLEY, D.A.; COHEN, F.S.; DOLSON, D.J.; BLAND, K.I.; COPELAND, E.M.3d. Glutamine-enriched diets support muscle glutamine metabolism without stimulating tumor growth. **J Surg. Res.**, **48(4)**:319-23, 1990.

KRAHL, M.E. In: **INSULINA action** Ed. I. B. Fritz. New York, Academic Press, 1972. p. 461-8

LACEY, J.M.; WILMORE, D.M. Is glutamine a conditionally essential amino acid? **Nutr. Rev.**, **48**:297-308, 1990.

LAWSON, D.H.; RICHMOND, A.; NIXON, D.H.; RUDMAN, D. Metabolic approaches to cancer cachexia **Annu. Rev. Nutr.**, **2**:227, 1982.

LIAW, C.C.; CHEN, J.S.; WANG, C.H.; CHANG, H.K.; HUANG, J.S. Tumor fever in patients with nasopharyngeal carcinoma: clinical experience of 67 patients. **Am. J. Clin. Oncol.**, **21(4)**:422-5, 1998.

LAZO, P.A. Amino acids and glucose utilization by different metabolic pathways in ascites-tumor cells. **Eur. J. Biochem.**, **117**:19-25, 1981.

LEIGHTON, B. & COOPER, G.J.S. Pancreatic amylin and calcitonin gene-related peptide cause resistance to insulin in skeletal muscle in vitro. **Nature**, **335**:632-5, 1988.

LUNDHOLM, K.; BENNEGARD, K.; EDEN, E.; SVANIGER, G.; EMERY, P.W.; et al. Efflux of 3-Methylhistidine from the Leg in Cancer Patients Who Experience Weight Loss. **Cancer Res.**, **42**:4807-11, 1982.

MALTIN, C.A.; DELDAY, M.I.; CAMPBELL, G.P.; HESKETH, J.E. Clenbuterol mimics effects of innervation on myogenic regulatory factor expression. **Am. J. Physiol.**, **265**:E176-8, 1993.

MALTIN, C.A.; HAY, S.M.; DELDAY, M.I.; SMITH, F.G.; LOBLEY, G.E.; REEDS, P.J. The effect of the anabolic agent, clenbutrol, on overloaded rat skeletal muscle. **Bioscience Reports**, v 7, 2:143-1249, 1987a.

MALTIN, C.A.; HAY, S.M.; DELDAY, M.I.; SMITH, F.G.; LOBLEY, G.E.; REEDS, P.J. Clenbuterol a Beta Agonist, induces growth in innervated and denervated rats soleus muscle via apparently different mechanisms. **Bioscience Reports**, v 7, 6:525-32, 1987b.

MANCHESTER, K.L. Insulin and protein synthesis. In: **Biochemical action of hormones**. Ed. G. Litwack. New York, Academic Press, v.1 p.267-320, 1970.

MARONI, B.J.; KARAPANOS, G.; MITCH, W.E. System A amino acid transport in incubated muscles: effects of insulin and acute uremia. **Am. J. Physiol.**, **251**:F74-F80, 1986.

MATTHYS, P.; BILLIAU, A. Cytokines and cachexia. **Nutrition.**, **9**:763-70, 1997.

McADAMS, M.R.; PEK, S.B.; LANDS, W.E.M. The effect of flubiprofen, a potent inhibitor of prostaglandin synthesis, on insulin and glucagon release from isolated rat pancreas. **Endocrinology**, **114**:1364-70, 1984.

McCOY, T. A. and NEUMAN, R.E. The cultivation of Walker carcinosarcoma 256 in vitro from cell suspensions. **J. Nat. Cancer Inst.**, **16**:1221-9, 1956.

MCKEEHAN, W.L. Glucolysis, glutaminolysis and cell proliferation. **Cell. Biol. Int. Rep.**, **6**:635-50, 1992.

MEISTER, A. The specificity of glutamine synthetase and its relationships to substrate conformation at the active site. **Adv. Enzymol. Relat Areas. Mol. Biol.** **31**:183-218, 1968.

MEISTER, A. Glutamine synthetase from Mammalian Tissues. **Methods Enzymol.** **113**:185-99, 1985.

METZ, S.A; ROBERTSON, R.P.; FUJIMOTO, W.Y. Inhibition of prostaglandin and synthesis augments glucose-induced insulin secretion in cultured pancreas. **Diabetes**, **30**: 551-57, 1981.

MICOSSI, P.; PONTIROLI, A. E.; BARON, S.H.; TOMAYO, R.C.; LENGEL, F.; BEVILACQUA, H.; RAGGI, U.; NORBIATO, G.; FOA, P. Aspirin stimulates insulin and glucagon secretion and increases glucose tolerance in normal and diabetic subjects. **Diabetes**, **27**:1196-1204, 1978.

MIDER, G. B. ; TESLUK, H., and MORTON, J.J. Effects of Walker carcinoma 256 on food intake, body weight and nitrogen metabolism of growing rats. **Acta Unio Internat. Cancr., Louvain**, **6**:409-20, 1948.

MEDINA, M.A.; SANCHEZ-JIMENEZ, F.; MARQUES, J.; RODRIGUEZ QUESADA,A.; NUNES-DE-CASTRO, I. Relevance of glutamine metabolism to tumor cell growth. **Mol. Cell Biochem.**, **113**:1-15, 1992.

MOLEY, J.F.; MORRISON, S.D.& NORTON, J.A. Preoperative insulin reverses cachexia and decrease mortality in tumor bearing rats. **J. Surg. Res.**, **43**:21-8, 1987

MORRISON, S.D. In: **Influence of development on the host**. A. L. Liotta, Ed. Kluwer Acad. Publ., The Netherlands, 1989, pp.176-213.

MORTON, R.H.; AGBENYEGA, E.T.; HATTON, P.A.; WAREHANI, A. C. Effects of clenbuterol and ICI118551, a selective  $\beta_2$ -agonist, on the growth of skeletal muscle of sucking rats. *Pfluger Archiv. Eur. J. of Physiol.*, 2:237-43, 1995.

NELSON, K.A.; WALSH, D.; SHEEHAN, F.A. The cancer anorexia-cachexia syndrome. *Journal of Clinical Oncology*, 12:213-25, 1994.

NEWSHOLME, E.A.; CRABTREE, B.; ARDAWI, M.S.M. Glutamine metabolism in lymphocytes its biochemical, physiological and clinical importance. *Q.J.Exp.Physiol.*, 70:473-79, 1985.

NEWSHOLME, E.A.; LEECH, A. R. **Biochemistry for the medical**. Science Jhon Wiley; New York, 1993.

NEWSHOLME, E.A.; NEWSHOLME, P.; CURI, R. ARDAWI, MSM. Glutamine metabolism in different tissues: its physiological importance In: **perspectives in clinical importance nutrition** (ed J.M. Kinney; P.R. Borum), Urban and Schwarzenberg, Baltimore-Munich, pp. 71-97, 1989.

NOGUCHI, Y; MAKINO, T.; YOSHIKAWA, T; NOMURA, K.; FUKUZAWA, K.; MATSUMOTO,A.; YAMADA, T. The possible role of TNF-alpha and IL-2 in inducing tumor-associated metabolic alterations. **Surg. Today**, **26(1)**:36-41, 1996.

PACITTI. A. J.; INOUE, Y.; SOUBA, W.W. Characterization of Na<sup>+</sup>-independent glutamine transpport in rat liver. **Am. J. Physiol.**, **265**:690-8, 1993.

PARRY-BILLINGS,M; LEIGHTON, B.; DIMITRIADIS, G.D.;CURI, R.; BOND, J.; BEVANS, S.; COLQUHOUN, A.; NEWSHOLME, E.A. The effect of bearing on skeletal muscle glutamine metabolism. **Int. J. Biochem.**, **23(9)**:933-7, 1991.

PARRY-BILLINGS,M.; BEVAN,S.J.; OPARA, E.; LIU,C.T., DUNGR,D.B.; NEWSHOLME,E.A. The effects of growth hormone and insulin-like growth factors I and II on glutamine metabolism by skeletal muscle of the rat in vitro. **Horm. Metab. Res.**, **25(5)**:243-5, 1993.

PEARLSTONE, D.B.; LEE.J.I.;ALEXANDER, R.H.; CHANG, T.H.; BRENNAN,M.F.; BURT,M. Effect of enteral and parenteral nutrition on amino acid levels in cancer patients. **J.P.E.N. J. Parenter Enteral Nutr.**, **19(3)**:204-8, 1995.

PEARLSTONE, D.B.; WOLF, R.F.; BERMAN, R.S.; BURT, M.; BRENNAN, M.F. Effect of systemic insulin on protein kinetics in postoperative cancer patients. **Ann. Surg. Oncol.**, **4**:321-32, 1994.

PEDERSEN, P.L. Tumor mitochondria and bioenergetics of cancer cells. **Prog. Exp. Tumor Res.**, **22**:190-274, 1978.

PEREZ-LIAMAS, F.; SASTRE, J.F.; ZAMORA, S. Influence of dietary protein level on growth: effect of clenbuterol. **Comp. Biochem. Physiol.**, **99(4)**:671-5, 1991.

PIFFAR, P.M. **Redução da velocidade de crescimento tumoral pela administração de naproxeno, clenbuterol e insulina em ratos portadores de tumor de Walker 256.** Monografia apresentada para obtenção do título de Especialista. UFPR, Curitiba, 1999.

PRESTON, T. FEARON, K.; ROBERTSON, I.; et al.: **Tissue loss during severe wasting in lung cancer patients,** Institute of Physical Sciences in Medicine, London, England, pp. 60-9, 1987.

PUCCIO, M.; NATHANSON, L. The cancer cachexia syndrome. **Semin. Oncol.**, **24(3)**:277-87, 1997.

REEDS, P.J.; HAY, S.M.; DORWWOD, P.M.; PALMER, R.M. Stimulation of muscle growth by clenbuterol: lack of effect on muscle protein biosynthesis. **Br. J. Nutr.**, **56**:249-58, 1986.

RENNIE, M.J.; AHMED, A.; KHOGALI, S.E.; LOW, S.Y.; HUNDAL, H.S.; TAYLOR, P.M. Glutamine metabolism and transport in skeletal muscle and heart and their clinical relevance. *J. Nutr.*, **126**:1142S-9S, 1996.

RENNIE, N.J.; MACLENNAN, P.A.; HUNDAL, H.S.; WERYK, B.; SMITH, K.; TAYLOR, P.M.; EGAN, C.; WATT, P.W. Skeletal muscle glutamine transport, intramuscular glutamine concentration, and muscle-protein turnover. *Metabolism*, **38**:47-51, 1989.

RENNIE, N.J.; TADROS, L.; KHOGALI, S.; AHMED, A.; TAYLOR, P.M. Glutamine transport and its metabolic effects. *J. Nutr.*, **124**:1503S-1508S, 1994.

RIVERA, S.; AZCÓN-BIETO, J.; LÓPEZ-SORIANO, F.J.; MIRALPEIX, M.; ARGILÉS, J.M. Amino acid metabolism in tumor-bearing mice. *Biochem. J.*, **249**:443-9, 1988.

ROBERTSON, R.P. Prostaglandins as modulators of pancreatic islet function. *Diabetes*, **28**:942-8, 1979.

ROE, S.Y.; COOPER, A.; MORRIS, I.D.; ROTHWELL, N.J. Involvement of prostaglandins in cachexia induced by T-cell leukemia in the rat. *Metabolism*, **46**(4):359-65, 1997.

ROHDE, T.; MACLEAN, D.A.; KLARLUNG PETERSON, B. Lymphocyte proliferation and cytokine production. **Scand. J. Immunol.**, **44(6)**:648-50, 1996.

SAKURAI, Y.; KLEIN, S. Metabolic alteration in patients with cancer: nutritional implications. **Surg. Today**, **28(3)**:247-57, 1998.

SAUX, M.C.; GIRAULT, B.; BOUQUET, S.; FOURTILLAN, J.B.; and COURTOIS, P. Comparative study of the tissue distribution of two beta-mimetics: clenbuterol and salbutamol in the dog. **J. Pharmacol.**, **17**:692-98, 1986.

SCHNEIDER, W.C. and HOGEBROOM, G.H. Intracellular distribution of enzymes. VI. The distribution of succinoxidase and cytochrome oxidase activities in normal mouse liver and in mouse hepatoma. **J. Natl. Cancer Inst.**, **10**:969-75, 1950.

SCISLOWSKI, P.W.D., NIBLOCK, A., LINDSY, Y., WERYK, B., WATT, P.W., RENNIER, M.J. Glutamine stimulates glycogen synthesis in skeletal muscle. **Clin. Nutr.**, **8**:80, 1989.

SIDDIQUI, R.A.; WILLIAMS, J.F. Interactions of vasopressin and prostaglandin  $E_2$  in the development of cancer cachexia. **Med. Sci.**, **15**:45-6, 1987.

SHAW, J.H.F. and WOLFE, R.R. Fatty acid and glycerol kinetics in septic patients and in patients with gastrointestinal cancer. **Ann. Surg.**, **205**:368, 1987.

SHIFF, S.J.; KOUTSOS, M.I.; QIAO, L.; RIGAS, B. Nonsteroidal antiinflammatory drugs inhibit the proliferation of colon adenocarcinoma cells: effects on cell cycle and apoptosis. **Exp. Cell Res.**, **222(1)**:179-88, 1996.

SMITH, K.L.; TISDALE, M.J. Increased protein degradation and decrease synthesis in skeletal muscle during cancer cachexia. **Br. J. Cancer.**, **67(4)**:680-5, 1993.

SMITH, R.J.; WILMORE, D.W. Glutamine nutrition and requirements. **J. Parenter Enteral Nutr.**, **14**:94S-9S, 1990.

STALLION, A.; ZHANG, F-S.; CHANCE, W.T.; FOLEY-NELSON, T.; and FISCHER, J.E. Reversal of cancer of cachexia in rats by Cimaterol and supplemental nutrition. **Surgery.**, **110**: 678-84, 1991.

STALLION, A.; FOLEY-NELSON, T.; CHANCE, W.T.; FISCHER, J.E. Effects of increased  $\beta_2$ -Agonist dose in tumor-bearing animals. **Nutrition and Cancer.**, **20(3)**:251-60, 1993.

STRAUS, D.S. Growth-stimulatory actions of insulin in vitro and in vivo. **Endocr. Rev.**, **5**:356-69, 1984.

STRELKOV, A.B.; FIELDS, A.L.; BARACOS, V.E. Effects of systemic inhibition of prostaglandin production on protein metabolism in tumor-bearing rats. **AM. J. Physiol.**, **257**:C261-9, 1989.

SOUBA, W.W. Glutamine and cancer. *Ann. Surg.*, **218(6)**:715-28, 1993.

SOUBA, W.W.; STREBEL, F.R.; BULL, J.M.; COPELAND E.M., TEAGTMEYER, H. CLEARY, K. Interorgan glutamine metabolism in tumor-bearing rats. *J Surg. Res.*, **44(6)**:720-6. 1988.

SUZUKI, Y.; SHEN, T.; POYARD, M.; BEST-BELPOMME, M.; HANOUNE, J.; DEFER, N. Expression adenylyl cyclase mRNAs in the denervated and in the developing skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* **274**, **43**:C1674-85, 1998.

TAYEK, A.J. A Review of Cancer Cachexia and Anormal Glucose Metabolism in Humans with Cancer. *Journal of the American College of Nutrition*, **4**:445-6, 1992.

TESSITORE, L.; BONELLI, G.; BACCINO, F.M. Early developement of protein matabolic perturbations in liver and skeletal muscle of tumor-bearing rats. A model system for cancer cachexia. *Biochem. J.*, **241**:153-9, 1987.

TESSITORE, L.; COSTELLI, P.; BACCINO, F.M.; Humoral mediation for cachexia in tumor-bearing rats. *Br. J. Cancer*, **67(1)**:15-23, 1993.

TISDALE, W.J. Cancer cachexia: metabolic alterations and clinical manifestations. **Nutrition**, **13(1)**:1-7, 1997.

THEOLOGIDES, A. Cancer cachexia. **Cancer**, **43**:2004-12, 1979.

THOMPSON, M.P.; KOONS, J.E.; TAN, E.T.H., and GRIGOR, M.R. Modified Lipoprotein Lipase Activities, Rates of Lipogenesis, and Lipolysis as Factors Leading to Lipid Depletion in C57BL Mice Bearing the Preputial Gland Tumour ESR-586. **Cancer Res.**, **41**:3228-232, 1981.

TORTI, F.M.; DIEKMANN, B.; BEUTLER, B.; CERAMI, A.; RINGOLD, G.M. macrophage factor inhibits adipocyte gene expression: na "in vitro" model of cachexia. **Science**, **229**:867-9, 1985.

TRACEY, K.J.; LOWRY, S.F.; FAHEI III, T.J.; ALBERT, J.D.; FONG, Y.; HESSE, D.; BEUTLER, B.; MANOGUE, K.R.; CALVANO, S.; WEI, H.; CERAMI, A.; SHIRES, G.T. Cachectin/Tumor Necrosis Factor induces lethal shock and stress hormone responses in the dog. **Surg. Gynecol. & Obstet.**, **164**:415-22, 1987.

TREDGET, E.E.; YU, YM; ZHONG, S.; BURINI, R.; OKUSAWA, J.A. GELFANG, C.A.; DINARELLO, C.A.; YONG, V.R.; BUEKE, J.F. Role interlekin-1 and tumor necrosis factor on energy metabolism in rabbits. **Am. J. Physiol.**, **255**:E760-8, 1988.

TRINDER, R. Determination of glucose in the blood using glucose oxidase with alternative oxygen acceptor. **Ann. Clin. Biochem.**, **6**:24-7, 1969.

VARNIER, M.; BLEESE, G.P.; THOMPSON, J.;RENNIER, M.J. Stimulatory effect of glutamine na glycogen accumulation in human skeletal muscle. **Am. J. Physiol.**, **269**:E306-E315, 1995.

WARBURG,O. **Metabolism of Tumors**. Arnold Constable, London, 1930

WATERHOSE, D. Lactate metabilism in patients with cancer. **Cancer**, **33**:66-71, 1974.

WILLIAMS, R.J.; WILSON, J.D.; FOSTER, D.W. In: Wilson, J.D.; Foster, D.W. **Williams Textbook of Endocrinology** 8, ed., p.1223-34, 1992.

WONG, K.; BOHELER, K.R.; BISHOP, J.; PETROU, M.; YACOUB, M.H. Clenbuterol indices cardiac hypertrophy with normal functional, morphological and molecular features. **Cardiov. Res.**, **37(1)**:115-22, 1998.

WONG, K.; BOHELER, K.R; PETROU, M.; YACOUB, M.H. Pharmacological modulation of pressure-overload cardiac hypertrophy: Changes in ventricular function, extracellular matrix, and gene expression. **Circulation**, **96(7)**:2239-46, 1997.

YAQOOB, P.; CALDER.P.C. Cytokine production by human peripheral blood mononuclear cells: Differential sensitivity to glutamine avaliability. **Cytokine**, **10**:790-4, 1998.

YANG, V.T.; and McELLIGOT, M.A. Multiple actions of  $\beta_2$ -adrenergic agonists on skeletal muscle and adipose tissue. **Biochem. J.**, **261**:1-10, 1989.

YOSHIMURA, T.; KURITA, C.; NAGAO, T.; USAMI, E.; NAKAO, T.; WATANABE, S.; KOBAYASHI, J.; YAMAZAKI, K.; TANAKA, H.; INAGAKI, N.; NAGAI, H. Inhibition of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1-beta production by beta-adrenoceptor agonists from lipopolysaccharide-stimulated human peripheral blood mononuclear cells. **Pharmacology**, **54(3)**:144-52, 1997.