SECRETAR: DE PÓS-GRADUAÇ I. 8.

# UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

# ANDRÉ GUSTAVO DE OLIVEIRA

"AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE O TRATAMENTO COM METFORMINA E SUPLEMENTAÇÃO NUTRICIONAL COM LEUCINA NO METABOLISMO PROTÉICO DE RATOS PORTADORES DO TUMOR DE WALKER 256"

Este	e exemplar corresponde à redação	final
da	tese defendida pelo(a) candidato	(a)
241	ndré jutero de l'heire	
1	- siliester	3
e a	provada pela Comissão Julgadora.	

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Mestre em Biologia Funcional e Molecular, na área de Fisiologia.

# Orientadora: Profa. Dra. Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes

Campinas, 2011

#### FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR ROBERTA CRISTINA DAL' EVEDOVE TARTAROTTI – CRB8/7430 BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

OL4a	Oliveira, André Gustavo de, 1980- Avaliação da associação entre o tratamento com metformina e suplementação nutricional com leucina no metabolismo protéico de ratos portadores do tumor de Walker 256 / André Gustavo de Oliveira. – Campinas, SP: [s.n.], 2011.
	Orientador: Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.
	1. Caquexia. 2. Tumor Walker 256. 3. Leucina. 4. Metformina. 5. Proteínas - Metabolismo. I. Gomes- Marcondes, Maria Cristina Cintra, 1961 II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Effects of metformin treatment associated to leucine rich-diet on protein metabolism in Walker 256 tumour-bearing rats Palavras-chave em Inglês: Cachexia Walker 256 tumour Leucine Metformin Proteic metabolism Área de concentração: Fisiologia Titulação: Mestre em Biologia Funcional e Molecular Banca examinadora: Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes [Orientador] Miguel Arcanjo Areas José Barreto Campello Carvalheira Data da defesa: 13-07-2011 Programa de Pós Graduação: Biologia Funcional e Molecular

Campinas, 13 de julho de 2011

#### BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes (Orientadora)

Prof. Dr. Miguel Arcanjo Areas

Prof. Dr. José Barreto Campello Carvalheira

Profa. Dra. Ana Paula Couto Davel

Prof. Dra. Estela Maria Gonçalves

Assidatura Assinatura

Assinatura

Assinatura

Assinatura

Dedico este trabalho aos meus pais, Maria Inês e Aparecido, aos meus irmãos, Alexandre e Rafael, à minha namorada, Keli e à minha sogra, Angelina.

# AGRADECIMENTOS

À professora Dra. Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes, por sua orientação e ensinamentos ao longo de todos esses anos.

Aos colegas do laboratório de nutrição e câncer.

Aos professores que participaram do exame de qualificação: Dra. Maria Alice Rostom de Mello, Dra. Dora Maria Grassi Kassisse e Dr. Miguel Arcanjo Areas, pelas ótimas contribuições para melhoria deste trabalho.

Aos professores que participaram da defesa de dissertação: Dr. José Barreto Campello Carvalheira e Dr. Miguel Arcanjo Areas, pelas correções e sugestões que contribuíram muito para a melhoria deste trabalho e também pelas idéias que certamente serão aplicadas em trabalhos futuros.

Aos funcionários e docentes do departamento de Anatomia, Biologia Celular e Fisiologia e Biofísica, IB – UNICAMP.

Aos amigos Lucas, Bruno, Victor, René, Francisco, Tiago e Maurício pelas inúmeras discussões e momentos de descontração futebolística.

À minha família, que sempre me apoiou e incentivou a seguir na carreira acadêmica.

À minha namorada, Keli, pelo apoio e companheirismo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pelo apoio financeiro (processo nº 2008/07737-0).

#### RESUMO

O crescimento do câncer promove o desenvolvimento de caquexia em função de intensa espoliação de nutrientes, principalmente, de gordura e proteína corpórea total. A via de sinalização da mTOR controla o crescimento celular e alguns estudos apontam que a inibição dessa via por metformina (M) pode diminuir a taxa de desenvolvimento tumoral. Desse modo, o presente estudo avaliou os efeitos da administração de metformina associada à dieta rica em leucina (L), em animais com tumor de Walker 256 (W), sobre o metabolismo protéico muscular, na hipótese de melhorar o estado caquético. Ratos Wistar jovens foram distribuídos em oito grupos, de acordo com a presença ou não de tumor, tratamento com metformina (36 mg x Kg<sup>-1</sup>) e/ou dieta rica em leucina (dieta com excesso de 3%). Foram analisados parâmetros somáticos e bioquímicos bem como vias de sinalização celular no músculo gastrocnêmico. No grupo W, o crescimento tumoral induziu perda de 20% da massa corpórea; proporcionou redução de 70% na massa gorda, alem da diminuição da concentração sérica de glicose, de proteínas totais e albumina. As concentrações de GH e IGF-1 foram reduzidas, porém a concentração de ACTH foi elevada em todos os grupos com tumor. Os grupos portadores de tumor tiveram maiores taxas de degradação protéica muscular, embora as taxas de síntese não tenham sido alteradas. A suplementação com leucina estimulou a síntese protéica nos animais não portadores de tumor, e os resultados sugerem que esse efeito tenha sido via Akt ou Erk, enquanto que a metformina estimulou a sinalização via IRS-1, levando à ativação de Erk. A evolução tumoral promoveu espoliação da massa protéica e modulação dos processos de síntese protéica, através da inibição da Erk e IRS-1. A suplementação com leucina foi capaz de estimular a síntese protéica nos animais não portadores de tumor, porém o tratamento com metformina não foi eficaz em diminuir o crescimento das células tumorais, provavelmente em função da baixa concentração que foi administrada aos animais.

### ABSTRACT

Tumour growth induces cachexia by intense nutrient waste, characterized by involuntary host weight loss, mainly depleting the total body protein and fat. mTOR signaling pathway controls the cell growth regulating translation of mRNA, and the inhibition of this pathway by compounds such as metformin (M) could decrease tumour growth rate. Knowing these facts, the aim of this study was to evaluate metformin effects associated to leucine-rich diet in Walker 256 (W) tumour-bearing animals, on muscle protein metabolism, trying to improve the cachectic state. Young male Wistar rats were distributed into 8 groups, according to the tumour implant, the treatment with metformin (36 mg x kg<sup>-1</sup>) and/or leucine-rich diet (3% leucine). After the sacrifice of the animals we evaluated some somatic and biochemical parameters as well as the muscle cell signaling pathways. Tumour growth promotes 20% reduction of body mass and 70% of fat mass. Glucose serum was 50% decreased and also the total serum proteins (20% less) and albumin (25% reduced). GH and IGF-1 concentrations were decreased in all tumour-bearing groups, while ACTH concentration was increased. Tumour-bearing groups had higher protein degradation rates while protein synthesis rates were not changed, showing decreased protein turnover. Leucine rich-diet stimulated protein synthesis in non-tumour-bearing groups and these results suggest that this effect was through Akt or Erk pathways and metformin stimulated signaling through IRS-1, leading to Erk activation. Tumour growth promoted lean body mass spoliation and modulated protein synthesis through Erk and IRS-1 inhibition. Leucine-rich diet was able to stimulate protein synthesis in non tumour-bearing animals, although the treatment with metformina was not thus effective in decreasing tumour's cells growth, probably by low dose concentration.

Walker 256 Tumour, Leucine, Metformin, Cachexia, Protein Metabolism

# SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	5
1.1.	Metformina	6
1.2.	Leucina	8
1.3.	Complexo ubiquitina-proteossomo	10
1.4.	mTOR	12
2.	OBJETIVOS	15
2.1.	Objetivos específicos	15
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1.	Dietas e tratamento com metformina	18
3.2.	Protocolo experimental	18
3.3.	Concentração sérica de glicose, proteínas totais, albumina e globulin	as. 20
3.4.	Concentração de glicogênio hepático	21
3.5.	Análise da expressão de proteínas por <i>immunoblotting</i>	22
3.6.	Análise de hormônios e vias de sinalização	23
3.7.	Ensaio de síntese e degradação protéica	24
3.8.	Análise estatística	25
4.	RESULTADOS	26
4.1.	Parâmetros Somáticos	26
4.2.	Parâmetros Séricos e Teciduais	34
4.3.	Vias de Sinalização Celulares	43
5.	DISCUSSÃO	55
6.	CONCLUSÕES	65
7.	ANEXOS	75
7.1.	Tabelas suplementares	75
7.2.	Certificado e declaração da Comissão de ética	78

# LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Possíveis mecanismos pelos quais a metformina pode inibir o crescimento tumoral7
Figura 2: Conceitos recentes das vias de sinalização da insulina e aminoácidos que estimulam a síntese protéica induzida por mTORC19
Figura 3: A ubiquitinização e degradação de substratos protéicos são obtidas por reações em série mediadas pelas enzimas do Sistema Ubiquitina Proteossomo (UPS) 12
Figura 4: Controle da mTORC1 por aminoácidos13
Figura 5: Concentração de glicogênio hepático26
Figura 6: Peso da carcaça27
Figura 7: Peso relativo do coração28
Figura 8: Peso relativo do fígado29
Figura 9: Peso relativo do baço30
Figura 10: Peso relativo da glândula adrenal30
Figura 11: Peso relativo da gordura perirrenal31
Figura 12: Peso relativo da gordura inguinal32
Figura 13: Peso relativo do músculo gastrocnêmio33
Figura 14: Peso relativo do tumor34
Figura 15: Concentração sérica de glicose35
Figura 16: Concentração sérica de proteínas totais
Figura 17: Concentração sérica de albumina36
Figura 18: Concentração sérica de globulinas37
Figura 19: Concentração sérica de GH38
Figura 20: Concentração sérica de IGF-139

Figura 21: Concentração sérica de ACTH	39
Figura 22: Concentração de proteína no músculo gastrocnêmio	40
Figura 23: Concentração de tirosina no meio de incubação	41
Figura 24: Concentração de fenilalanina no músculo gastrocnêmio	42
Figura 25: Razão entre síntese e degradação protéica no músculo gastrocnêmio	43
Figura 26: (A) concentração de IRS-1 total, (B) concentração de IRS-1 fosforilada e ( relação entre as concentrações de IRS-1 fosforilada e IRS-1 total no músci gastrocnêmio	(C) ulo 44
Figura 27: (A) concentração de Stat-3 total, (B) concentração de Stat-3 fosforilada e ( relação entre Stat-3 fosforilada e Stat-3 total no músculo gastrocnêmio	(C) 45
Figura 28: Concentração de Stat-6 fosforilada no músculo gastrocnêmio	46
Figura 29: (A) concentração de Jnk total, (B) concentração de Jnk fosforilada e ( relação entre Jnk fosforilada e Jnk total no músculo gastrocnêmio	(C) 47
Figura 30: (A) concentração de Erk Total, (B) concentração de Erk fosforilada e ( relação entre Erk fosforilada e Erk total no músculo gastrocnêmio	(C) 48
Figura 31: (A) concentração de Akt total, (B) concentração de Akt fosforilada e ( relação entre Akt fosforilada e Akt total no músculo gastrocnêmio	(C) 49
Figura 32: (A) concentração de p70S6K total, (B) concentração de p70S6K fosforilada (C) relação entre p70S6K fosforilada e p70S6K total no músculo gastrocnêmio	ае 50
Figura 33: Expressão da proteína GADPH	51
Figura 34: Expressão da proteína elF4G	51
Figura 35: Expressão da proteína 4E-BP1	52
Figura 36: (A) expressão da proteína 20S, (B) expressão da proteína 19S e ( expressão da proteína 11S	(C) 53
Figura 37: Expressão da proteína E2	54

# LISTA DE ABREVIATURAS

- ACTH hormônio adrenocorticotrópico
- ATP trifosfato de adenosina
- BCAA aminoácidos de cadeia ramificada
- DTT ditiotreitol
- EDTA ácido etilenodiamino tetra-acético
- FCS soro fetal bovino
- FNa fluoreto de sódio
- Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> vanadato de sódio
- GAPDH gliceraldeido 3-fosfato desidrogenase
- GH hormônio do crescimento
- HRP horseradish peroxidase
- IGF-1 fator de crescimento semelhante à insulina
- KHB tampão Krebs Henseleit
- KDa quilodalton
- MgCl<sub>2</sub> cloreto de magnésio
- NaOH hidróxido de sódio
- Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> pirofosfato de sódio
- PAGE eletroforese em gel de poliacrilamida
- PMSF fenil-metil-sulfonil fluoreto
- PVDF fluoreto de Polivinilideno
- RNAm ácido ribonucleico mensageiro
- SDS dodecil sulfato de sódio
- TCA ácido tricloroacético
- Tris tris(hidroximetil)aminometano

# 1.INTRODUÇÃO

A intensa perda de peso e anorexia estão entre as características mais comuns observadas em pacientes com câncer associado ao prolongado estresse catabólico. Mais de 50% dos pacientes com câncer apresentam excessiva perda de peso, demonstrando quadro de caquexia. Essa situação é citada como sendo a causa mais frequente de morbidade e mortalidade (CHOUDRY *et al.,* 2006). A manutenção de nutrição adequada e preservação de massa magra são fatores que podem contribuir para o aumento da sobrevida de pacientes em estado catabólico, aumentando suas chances de resistirem aos tratamentos clínicos convencionais, bem como aumentar a qualidade de vida desses pacientes.

Em pacientes com câncer, o mecanismo pelo qual a diminuição da síntese protéica ocorre não é bem compreendido, enquanto que o aumento na degradação protéica é atribuído ao aumento da expressão das enzimas envolvidas na via ubiquitina-proteossomo (KHAL *et al.*, 2005).

Assim, vários estudos apontam que a suplementação nutricional bem como terapias coadjuvantes, poderiam melhorar, reduzindo ou inibindo, o intenso processo de espoliação corpórea que ocorre no estado caquexia-câncer, podendo também modular o processo de evolução tumoral. Estudos prévios mostraram que a suplementação nutricional com leucina modulou a espoliação da musculatura estriada. Outros estudos têm demonstrado que a metformina além de proporcionar melhor captação de glicose pelos tecidos periféricos também atua como modulador de crescimento celular. Desse modo, avaliar a associação entre dieta rica em leucina - direcionando para preservação da massa corpórea - e o tratamento com metformina - modulação do crescimento

neoplásico - representa um fator bastante interessante e importante da pesquisa básica e translacional na tentativa de preservar a qualidade e sobrevida dos pacientes com câncer.

## 1.1. Metformina

A metformina (*N*,*N*-dimetilbiguanida ou 1,1-dimetilbiguanida) é um fármaco de uso oral amplamente utilizado no tratamento de pacientes com diabetes *Mellitus* do tipo II. Embora os mecanismos celulares pelos quais a metformina exerce seus efeitos não estejam totalmente esclarecidos, há evidências que a metformina age sobre o receptor de insulina, aumentando a sinalização através desse receptor e, dessa maneira, levando a melhora na resistência periférica à insulina seguida por diminuição nos níveis circulantes de insulina (CANTRELL *et al.*, 2009; KOURELIS e SIEGEL, 2011). A metformina é capaz de diminuir a produção hepática de glicose e aumentar a captação de glicose em células musculares (GALUSKA *et al.*, 1994; HUNDAL *et al.*, 1992). Outra característica da metformina parece ser a ativação da proteína quinase dependente de AMP (AMPK) em células do tecido muscular, adiposo e hepático (ZHOU *et al.*, 2001).

O aumento na atividade de AMPK promovido pela metformina resulta no estimulo da captação de glicose e oxidação de ácidos graxos, inibição da produção hepática de glicose, colesterol, síntese de triacilglicerois e lipogênese (RUDERMAN *et al.*, 2003), diminuindo a relação AMP/ATP e, dessa forma, exercendo sua função na homeostase celular nos tecidos periféricos dos pacientes diabéticos.

Estudos recentes demonstram que a metformina ativa a AMPK tanto *in vivo* quanto *in vitro* (ZHOU *et al.*, 2001) e muitos experimentos têm descrito o seu potencial terapêutico na inibição da mTOR, induzindo efeitos anti-proliferativos e anti-

angiogênicos em modelos pré-clínicos, como o tratamento de pacientes com câncer, doenças cardíacas, auto-imunes e metabólicas (WULLSCHLEGER *et al.*, 2006, INOKI *et al.*, 2003; MANNING *et al.*, 2002; VAN SLEGTENHORST *et al.*, 1998).

O efeito anti-proliferativo da metformina foi demonstrado utilizando-se células MCF-7, BT-474 e SKBR-3, linhagens celulares derivadas de cânceres de mama humanos, nas quais a metformina inibiu a proliferação celular, a formação de colônias e causou, pelo menos parcialmente, o arraste do ciclo celular para a fase G<sub>0</sub> (ALIMOVA *et al.*, 2009). Os autores sugerem que esses efeitos podem ter sidos causados pela metformina, que teria inibido Erk, Akt e mTOR (VIGNERI *et al.*, 2009).

A figura abaixo (Figura 1) esquematiza a atuação da metformina em diferentes tecidos, mostrando sua ação na diminuição do hiperinsulinemia, diminuição da proliferação celular, inibição de angiogênese e arraste do ciclo celular para a fase G<sub>0</sub>, todos causados pelo estímulo desse fármaco à LKB1 e AMPK (KOURELIS e SIEGEL, 2011).



**Figura 1:** Possíveis mecanismos pelos quais a metformina pode inibir o crescimento tumoral. Por ativar a AMPK, a metformina inibe a sinalização via mTOR, induzindo a célula a entrar em  $G_0$  e inibindo a síntese protéica nas células tumorais. Adicionalmente, a metformina diminui os níveis de insulina circulantes, inibe a angiogênese e exerce efeito tóxico nas células tumorais. Modificado de KOURELIS e SIEGEL, 2011.

## 1.2. Leucina

A leucina é um aminoácido essencial de cadeia ramificada, que sozinho corresponde a 8% dos aminoácidos nas proteínas corporais. Dentre os aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA's) incluem a valina (Val), isoleucina (Iso-Leu) e leucina (Leu).

GARLICK (2005) realizou experimentos para analisar a síntese protéica em músculo esquelético de ratos, através da administração dos três BCAAs em conjunto e isolados (Val, Iso-Leu ou Leu), mostrando que a taxa de síntese protéica foi de aproximadamente 13%, na presença dos três BCAAs e, isoladamente, a Leu apresentou taxa estatisticamente igual.

Os BCAAs têm função vital na regulação do metabolismo de proteínas. BCAAs exógenos, principalmente leucina, estimulam a síntese protéica na musculatura isolada ou perfundida de ratos, assim como através da administração oral *in vivo* (VENTRUCCI *et al.*, 2007; GOMES-MARCONDES *et al.*, 2003). Estudos em animais e em ensaios clínicos demonstraram que a suplementação com BCAAs aumenta o balanço de nitrogênio e recupera o organismo após lesões por queimaduras, danos por radiação, estresse pós-cirúrgico, sépsis e câncer (CHOUDRY *et al.*, 2006).

Trabalhos, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, corroboram o fato de que dieta suplementada com leucina estimula a síntese protéica, principalmente em musculatura esquelética (GARLICK, 2005), podendo reverter o quadro de catabolismo protéico bem como diminuir a mobilização da musculatura esquelética de ratos portadores de tumor de Walker 256 (VENTRUCCI *et al.*, 2004; GOMES-MARCONDES *et al.*, 2003), principalmente pela inibição do sistema ubiquitina-proteossomo.

O estimulo à síntese protéica promovido pela leucina parece estar associado ao aumento do início da tradução de RNAm através do aumento no número de polissomos e aumento na taxa de formação do complexo de iniciação 40S (LYNCH *et al.*, 2002).

Insulina e os BCAAs influenciam a síntese protéica por ativar a mTOR (LYNCH *et al.*, 2002), que, por sua vez, estimula etapas tardias de vias regulatórias da síntese protéica, como repressores de tradução, fator de iniciação eucariótico 4E (eIF4E) e a proteína quinase ribossomal 70 KDa (S6K1) (LYNCH *et al.*, 2002), como esquematizado na figura abaixo (SURYAWAN e DAVIS, 2010).



**Figura 2:** Conceitos recentes das vias de sinalização da insulina e aminoácidos que estimulam a síntese protéica induzida por mTORC1. A ligação da insulina ao seu receptor leva à fosforilação de IRS-1 e consequente aumento da atividade de PI3K. PI3K atua estimulando a atividade de PKB, que, por sua vez, fosforila proteína regulatórias associadas à mTOR, promovendo aumento em sua atividade e, consequentemente, estímulo para o processo de síntese protéica. Aminoácidos (especialmente a leucina) atuam sobre diferentes proteínas dessa via, regulando, em última instância, a síntese protéica. IRS-1 (substrato do receptor de insulina), PI3K (fosfoinositídeo-3 Kinase), PKB (proteína quinase B), TSC1/2 (complexo de esclerose tumoral 1 e 2), Rheb (homólogo da proteína Ras *enriched in brain*), PLD1 (fosfolipase D1), FKBP38 (proteína 38 de ligação à FK506), RagA-D (*ras-related GTP binding A-D*), mVps34 (*mammalian vacuolar protein sorting 34*), 4E-BP1 (proteína de ligação ao fator de iniciação 4E), S6K1 (S6 quinase 1). Modificado de SURYAWAN e DAVIS, 2010.

# 1.3. Complexo ubiquitina-proteossomo

A ubiquitina é um polipeptídeo com 76 resíduos de aminoácidos que desempenha funções essenciais em eucariotos através de sua conjugação covalente com outras proteínas intracelulares. A ubiquitinação regula muitas funções que são críticas para o funcionamento celular, frequentemente mediando a degradação seletiva de proteínas regulatórias por proteossomos, sendo a principal via de degradação protéica em eucariotos. A progressão do ciclo celular (KOEPP *et al.*, 1999), a indução da resposta inflamatória (GHOSH *et al.*, 1998) e a apresentação de antígenos (ROCK *et al.*, 1999) são alguns dos muitos processos regulados por proteólise dependente do complexo ubiquitina-proteossomo (PICKART, 2001).

A ubiquitinação de proteínas requer ações sequenciais de três enzimas: enzima ativadora de ubiquitina (E1), enzima conjugadora de ubiquitina (E2) e ligase ubiquitina-proteína (E3). Um tioéster é formado entre a extremidade C-terminal de uma glicina da ubiquitina e o sítio-ativo de cisteína. A ubiquitina é então transferida para o sítio-ativo de cisteína de E2 formando novamente um tioéster (PICKART, 2001).

Durante o processo de degradação protéica que ocorre durante a caquexia, as proteínas miofibrilares são primeiramente conjugadas com ubiquitina, a qual funciona como sinal para a degradação por um grande complexo proteolítico, o proteossomo 26S, o qual requer ATP para exercer suas funções (TISDALE, 1997).

O proteossomo 26S é um complexo de 2.000 KDa com atividade de protease que degrada proteínas poliubiquitinizada por um processo dependente de ATP (VOGES *et al.*, 1999). Apresenta núcleo catalítico, composto por unidade proteolítica chamada de proteossomo 20S, que é uma partícula em forma de barril composta de quatros

anéis sobrepostos com dois anéis  $\alpha$  externos e dois  $\beta$  internos (FAROUT *et al.*, 2003). Sítios catalíticos que contém resíduos de treonina são encontrados em três subunidades  $\beta$  ( $\beta$ 1,  $\beta$ 2,  $\beta$ 5) (VOGES *et al.*, 1999) as quais podem ser substituídas em células animais por 3 subunidades ( $\beta$ 1i,  $\beta$ 2i,  $\beta$ 5i) que possuem sítio ativo que também pode ser induzido por interferon- $\gamma$  (FAROUT *et al.*, 2003).

Principalmente dois complexos regulatórios podem se ligar ao anel α no final do proteossomo 20S. O 19S ou complexo PA700 contém aproximadamente 17 subunidades e associa-se de maneira dependente de ATP ao proteossomo 20S para formar o proteossomo 26S, com peso molecular de 2.500 KDa. Esse proteossomo, na presença de ATP, degrada proteínas modificadas por uma cadeia de poliubiquitina (DEMARTINO e SLAUGHTER, 1999) e pode, em alguns casos, hidrolisar algumas proteínas não ubiquitinizadas (VERMA e DESHAIES, 2000).

Em mamíferos, há outro complexo regulatório, o complexo 11S ou PA28, que é um anel heptamérico de 180 KDa, consistindo de duas subunidades homólogas  $\alpha \in \beta$ (LI e RECHSTEINER, 2001). Assim como o 19S, porém independentemente de ATP, esses anéis ligam-se a dois anéis  $\alpha$  do proteossomo 20S. O complexo 11S ativa o proteossomo 20S e promove, por exemplo, a produção de peptídeos antigênicos apresentados pelo complexo principal de histocompatibilidade classe I (MHC-I, do inglês *class I Major Histocompatibility Complex*) (FAROUT *et al.*, 2003)

O esquema a seguir (Figura 3) ilustra o sistema ubiquitina proteossomo, desde a ligação da molécula de ubiquitina à enzima E1, sua conjugação coma enzima E2, a ligação da ubiquitina com a proteína a ser ubiquitinizada (realizada pela enzima E3) e os efeitos biológicos dessa ativação.



Figura 3: A ubiquitinização e degradação de substratos protéicos são obtidas por reações em série mediadas pelas enzimas do Sistema Ubiguitina Proteossomo (UPS). Na reação de ativação, a ubiquitina é transferida para uma enzima E1 de maneira ATP-dependente (passo 1). A ubiquitina ativada é subsequentemente transferida para uma enzima E2 na reação de conjugação (passo 2). A enzima E2, por sua vez, transporta a ubiguitina para a enzima E3, que também é conhecida como ubiquitina ligase (passo 3). E3 é importante não apenas por ligar covalentemente a ubiquitina à resíduos de lisina no substrato protéico, mas também por ser substrato-específica. Este processo de ligação pode ser repetido com a lisina da própria ubiquitina como substrato, o que leva a formação de cadeias de poli-ubiquitina na proteína-alvo. Enzimas deubiquitinizantes podem reverter o processo de ubiquitizinação do substrato (passo 4). A ligação da poli-ubiquitina tem várias consequências biológicas para a proteína à ela conjugada: Por exemplo, cadeias de poli-ubiguitina ligadas a resíduos de lisina nas posições 11 e 48 endereçam essas proteínas para degradação proteossômica (passo 5). De maneira oposta, cadeias lineares de poli-ubiquitina ligadas a resíduos de lisina nas posições 63 e 11 promovem a montagem de complexos de sinalização (passo 6) .X, Y e Z indicam proteínas ligadas à ubiquitina. Pi, fosfato inorgânico: PPi, difosfato inorgânico. Ub, ubiquitina. Modificado de VUCIC et al., 2011 apud KRIKOS et al., 1992).

# 1.4. mTOR

A mTOR (do inglês, *mammalian Target Of Rapamycin*) é uma quinase de proteínas que pertence à família da PIKK (*phosphoinositide 3-kinase* (PI3K)-*related kinase*) (HAY *et al.*, 2004; WULLSCHLEGER *et al.*, 2006), formada por dois complexos multiprotéicos: mTORC1 (mTOR *Complex* 1) e mTORC2 (mTOR *Complex* 2).

Fatores de crescimento (insulina ou IGF-1), nutrientes (aminoácidos e glicose), bem como sensores do "*status*" energético celular (FINGAR *et al.*, 2004; FENG *et al.*, 2005; WANG & PROUD, 2009) aumentam a função de mTORC1 e esse aumento foi demonstrado através do aumento da fosforilação de S6 quinase ribossomal (S6K-1) e de 4E-BP1 (HARRIS & LAWRENCE, 2003).



**Figura 4:** Controle da mTORC1 por aminoácidos. Este diagrama sumariza os dados recentes, mostrando as funções de Rag e MAP4K3. As linhas pontilhadas e pontos de interrogação denotam potenciais conexões entre vias de sinalização para serem identificadas. Adaptado de WANG & PROUD, 2009.

A S6K-1 é a principal quinase nas células de mamíferos (AVRUCH et al., 2001) e, quando fosforilada, aumenta seletivamente a tradução de RNAm que codificam proteínas ribossomais e outros fatores de tradução (MEYUHAS, 2000), aumentando, desta maneira, a capacidade de tradução das células de uma maneira geral (INOKI et al., 2005). A etapa considerada como limitante da taxa de iniciação da tradução é a formação do complexo de iniciação eucariótico 4F (eIF4F) que modula o recrutamento da subunidade ribossomal 40S para o RNAm (MATHEWS *et al.*, 2007). EIF4F é constituída por eIF4E (que interagem com o *"cap"* de 7-metilguanosina presente na terminação 5' de todos os RNAm transcritos no núcleo), pela helicase eIF4A e pela grande proteína estrutural eIF4G (GINGRAS *et al.*, 1999). O complexo eIF4F é inibido por uma família de proteínas conhecidas como eIF4E-*binding proteins* (4E-BPs) que suprimem a tradução por competirem com a eIF4G pela ligação à eIF4E (GINGRAS *et al.*, 1999) A ligação das 4E-BP's ao eIF4E é regulado por fosforilação (GINGRAS *et al.*, 1999; PAUSE *et al.*, 1994) e essa fosforilação pode ser afetada pela mTOR (WULLSCHLEGER *et al.*, 2006).

A mTORC1 é um complexo protéico que consiste de mTOR, raptor (*regulatory associated protein of* mTOR) e mLST8. A mTORC2 também é um complexo protéico, composto por mTOR e Rictor (*rapamycin-insensitive companion of* mTOR), Sin-1 e proteínas mLST8.

A atividade da mTOR em células neoplásicas é aumentada em muitos tipos de cânceres como resultado de alterações genéticas ou ativação anormal dos componentes da via PI3-k/Akt (FENG *et al.*, 2005) contribuindo, dessa forma, para a desregulação da proliferação celular, crescimento e sobrevivência dessas células (HADAD *et al.*, 2008), bem como inibição da síntese protéica (VENTRUCCI *et al.*, 2001; VENTRUCCI *et al.*, 2004).

14

## 2. OBJETIVOS

Considerando que o câncer, a segunda causa de morte entre as diversas patologias, ainda representa um grande desafio quanto ao seu prognóstico e tratamento, novos estudos quanto à suplementação nutricional e associação com fármacos serão de grande valia para a melhora da qualidade de vida e a sobrevida desses pacientes.

Sabendo-se que a leucina atua na sinalização celular e que a metformina age inibindo a proliferação celular, tivemos por objetivos avaliar essa associação e seus efeitos sobre o crescimento de neoplasia maligna e o desenvolvimento do processo de caquexia em animais experimentais, na hipótese de preservar a massa magra corpórea (efeitos da sinalização da leucina e da metformina) com modulação do crescimento tumoral (efeitos da sinalização pela metformina).

# 2.1. Objetivos específicos

Em função do exposto acima, estudou-se animais portadores de carcinossarcoma de Walker 256, submetidos à suplementação nutricional com leucina e/ou tratados com metformina, comparando-os com animais controles com ou sem tumor, avaliando-se a variação de peso corpóreo e pesos relativos do coração, fígado, baço, adrenal, gordura perirrenal, gordura inguinal, gastrocnêmio e tumor, bem como a concentração sérica de proteínas totais, albumina, globulinas e glicose e concentração de proteína no músculo gastrocnêmio.

O estudo da espoliação da massa corpórea em função do crescimento tumoral e os efeitos da associação entre suplementação nutricional e/ou tratamento com metformina foi avaliado na musculatura esquelética (músculo gastrocnêmio), analisando-se o processo de síntese e degradação protéica, a taxa de incorporação de fenilalanina marcada com trício, expressão das proteínas eIF4G e 4E-BP1 (relacionados ao processo síntese) e a taxa de liberação de tirosina no meio de incubação, expressão das proteínas 20S, 19S, 11S e E2 (relacionados ao processo de degradação protéica).

Para estudarmos por quais vias de sinalização celular os processos de síntese ou degradação protéica estavam ou não sendo estimulados, avaliou-se a concentração sérica de GH e IGF-1 (hormônios anabólicos) e ACTH (hormônio relacionado com a ativação do processo de estresse e também com mobilização de substratos energéticos).

Com o mesmo objetivo de avaliar a sinalização celular da musculatura estriada, analisou-se a concentração de IRS-1 (total e fosforilada), Stat-3 (total e fosforilada), Stat-6 (fosforilada), Jnk (total e fosforilada), Erk (total e fosforilada), Akt (total e fosforilada), p70S6K (total e fosforilada) no músculo gastrocnêmio, uma vez que essas são proteínas-chave no processo de ativação da mTOR para o processo de síntese protéica.

# **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

Ratos Wistar foram obtidos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório (CEMIB) da UNICAMP, e receberam dieta e água *ad libitum*, com controle de luz claro-escuro de 12-12 horas e temperatura de  $22 \pm 2^{\circ}$ C.

As células tumorais foram obtidas do carcinossarcoma de Walker 256 (W), proveniente da linhagem do Banco de Tumores *Christ Hospital Line*, Arthur D'Little, EUA. Estas células foram mantidas *in vivo*, por inoculações na cavidade abdominal de ratos machos, feitas a cada sete dias. Após este período, foram retiradas as células neoplásicas da cavidade por punção e este líquido foi diluído na proporção 1:5. Cerca de 250.000 células viáveis (método de exclusão com azul de tripan) foram injetadas, no 1º dia do experimento, no flanco direito dos ratos experimentais, segundo método descrito por GOMES-MARCONDES (1998). Os animais dos grupos controles receberam inoculação de 0,5 mL de solução fisiológica (0,9 g/dL) no tecido subcutâneo do flanco direito. O tumor foi detectado por apalpamento, após o período de 4 a 5 dias após a inoculação e a evolução de crescimento tumoral foi obtida a partir do calculado do seu tamanho segundo a fórmula:

 $p = -0.079768 + 0.000456 \times C \times L \times E$ 

Sendo que p é o peso calculado do tumor; C é o comprimento; L é a largura; E é a espessura do tumor, segundo método descrito por GOMES-MARCONDES (1994).

Os animais foram eutanasiados quando o peso calculado do tumor atingiu 10% da massa corpórea total, o que ocorreu entre 13 e 15 dias após a inoculação das células tumorais. Os animais pertencentes aos grupos controles foram eutanasiados

entre 13 e 15 dias após o início do experimento para que o período de tratamento com metformina e/ou leucina não fosse diferente entre os grupos.

O protocolo experimental para manipulação dos animais com tumor foi aprovado segundo princípios éticos na Experimentação Animal (CEEA-IB-UNICAMP) segundo protocolo nº. 1763-1.

## 3.1. Dietas e tratamento com metformina

Os animais receberam dietas semipurificadas isocalóricas, definidas como: normoprotéica, que contem 18% de proteína normoprotéica, ou com suplementação de leucina (L), contendo 15% de proteína acrescida de 3% de L-leucina de acordo com AIN-93G (REEVES *et al.*, 1993). As dietas foram compostas por cerca de 70% de carboidratos (sacarose, dextrina e amido), 7% de gordura (óleo de soja) e 5% de fibra (micro-celulose purificada). As dietas foram complementadas com mistura vitamínica e de sais minerais, bem como cistina e colina. A dieta controle contém 1,6% de L-leucina e a dieta com alto teor de leucina contem 4,6% de L-leucina conforme padronização em nosso laboratório.

A metformina (M) foi administrada via gavagem intra-gástrica, na concentração de 36 mg x Kg<sup>-1</sup> de peso corpóreo (STITH *et al.*, 1998; COSTA, 2005).

## 3.2. Protocolo experimental

Ratos Wistar machos, com 28  $\pm$  1 dias de idade (peso corporal médio de 107,5 g; SD = 15,11 g), foram distribuídos de acordo com a presença ou não do carcinossarcoma de Walker 256 e presença ou não de tratamento com metformina e/ou leucina. Os animais foram distribuídos em oito grupos experimentais, a saber:

A. Ratos jovens submetidos à dieta normoprotéica (C);

B. Ratos jovens submetidos à dieta rica em L-leucina (L);

C. Ratos jovens submetidos à dieta normoprotéica e tratados com metformina (CM);

D. Ratos jovens submetidos à dieta rica em L-leucina e tratamento com metformina (LM);

E. Ratos jovens submetidos à dieta normoprotéica e implante de carcinossarcoma de Walker 256 (W);

F. Ratos jovens submetidos à dieta normoprotéica, implante de carcinossarcoma de Walker 256 e tratamento com metformina (WM);

G. Ratos jovens submetidos à dieta rica em L-leucina e implante de carcinossarcoma de Walker 256 (LW);

H. Ratos jovens submetidos à dieta rica em L-leucina, implante de carcinossarcoma de Walker 256 e tratamento com metformina (LWM).

Os animais permaneceram em gaiolas coletivas durante todo o período experimental e foram pesados três vezes por semana. Para os animais com implante de carcinossarcoma de Walker, grupos W, WM, LW e LWM também foram avaliados o comprimento, largura e espessura do tumor para determinação de seu volume e peso calculado.

Ao final do período experimental os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e foi coletado sangue para a análise de glicemia, concentração de IGF-1, GH e ACTH, e órgãos, tais como coração, fígado, baço, adrenal, gordura

inguinal, gordura perirrenal, músculo gastrocnêmio e tumor, para análise dos pesos absolutos e relativos e do conteúdo de proteínas teciduais totais. Foi retirado o músculo gastrocnêmio para ensaio de *immunoblotting* para análise da expressão de proteínas e ensaio de síntese e degradação protéica.

# 3.3. Concentração sérica de glicose, proteínas totais, albumina e globulinas

O sangue dos animais, coletado por punção cardíaca, após eutanásia dos animais, foi centrifugado a 10.000 x g por 10 minutos, a 4 °C.

A análise da concentração de glicose foi realizada utilizando-se amostras de 5  $\mu$ L plasma distribuídas em placas de 96 poços e acrescentado 200  $\mu$ L de reativo glicose oxidase-glicose peroxidase (Laborlab). Incubou-se a placa a 37 °C durante 10 minutos e realizou-se a leitura em espectrofotômetro com filtro de 540 nm (TRINDER, 1969).

Para a dosagem de proteínas totais, 5  $\mu$ L de plasma foram distribuídos em placas de 96 poços acrescidas com 200  $\mu$ L de reagente biureto (Laborlab), incubadas a 37 °C, por 15 minutos, e esperou-se que as amostras atingissem a temperatura ambiente para que, então, fossem lidas em espectrofotômetro com filtro de 540 nm (DOUMAS *et a*l., 1971).

A concentração de albumina foi determinada utilizando-se 5µL de amostra com 200 µL de reagente verde bromocresol (Laborlab), distribuídas em placa de 96 poços e mantidas à temperatura ambiente por 10 minutos. Após esse período realizou-se a leitura em espectrofotômetro com filtro de 620 nm (DOUMAS *et al.*, 1971).

A concentração sérica de globulina foi determinada subtraindo-se o valor da concentração de proteínas totais pelo valor da concentração de albumina do mesmo animal.

# 3.4. Concentração de glicogênio hepático

Amostras de fígado pesando aproximadamente 200 mg foram digeridas em 1 mL de KOH 30% em Banho-Maria por 15 minutos. Após a digestão, retiro-se 500 µL da amostra digerida e acrescento-se 500 µL de álcool etílico 96%. O volume do digerido foi determinado para posterior determinação do peso real da amostra.

Os 500  $\mu$ L de amostra digerida mais os 500  $\mu$ L de álcool foram, então, fervidos e, posteriormente, centrifugados por 10 minutos a 2000 x g. O sobrenadante foi eliminado e ao *pelet* foi adicionado 20  $\mu$ L de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e 200  $\mu$ L de NaOH 1N e resuspendido em vortex para posteriormente ser levado ao Banho-Maria por 10 minutos.

Acrescentou-se 50 μL da amostra e 200 μL solução contendo 94% de ácido acético glacial, 6% de Orto-toluidina PA e 1 g/L de tiouréia. Posteriormente, as amostras foram novamente colocadas em Banho-Maria por 10 minutos.

Após as amostras atingirem a temperatura elas foram, então, distribuídas em placas de 96 poços e lidas em espectrofotômetro com filtro de 620 nm (HASSID & ABRAHAMAS, 1957).

## 3.5. Análise da expressão de proteínas por *immunoblotting*

O músculo gastrocnêmio foi homogeneizado com tampão de homogeneização (Tris Base 100 mM, Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 10 mM, FNa 100 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1mM, EDTA 10 mM, PMSF 2mM, Aprotinina 0,1mg/mL, Triton X-100 1%, pH 7,4) e realizou-se análise do teor de proteína total (BRADFORD, 1976) e expressão de proteínas pertencentes ao sistema ubiquitína-poteossomo (subunidades proteossômicas 20S, 19S, 11S e E<sub>2</sub>), eIF4G, 4E-BP1, bem como a expressão da proteína GAPDH como controle. Uma parte do homogeneizado muscular foi adicionada à uma parte de LAEMMLI 2X (4% SDS, 20% glicerol, 0.2 M DTT, 0.004% azul de bromofenol, 0.125 M Tris – pH 6,8). Utilizou-se a técnica de SDS-PAGE (8 a 12% de acrilamida para o gel de resolução e 4% para o gel de empilhamento) para fazer a separação de 40 µg de proteína do homogeneizado muscular e posterior transferência para membrana de PVDF. A determinação da expressão de proteínas do sistema ubiquitina-proteossomo foi avaliada com anticorpos para as subunidades  $20S\alpha$  (Affinity, diluição 1:2000), 19S (Affinity, diluição 1:500) e subunidade 11S (Affinity, diluição 1:2000), E<sub>2</sub> (Affinity, diluição 1:1000), eIF4G (Santa Cruz Biotechnology, diluição 1:1000), 4E-BP1 (Santa Cruz Biotechnology, diluição 1:1000) e GAPDH (Santa Cruz Biotechnology, diluição 1:1500). A determinação da presenca dessas proteínas foi realizada utilizando-se anticorpos secundários anti-rabbit para 19S, 11S, 4E-BP1 e GAPDH (Cell Signaling, diluição: 1:10000), anti-mouse para 20S (Santa Cruz Biotechnology, diluição 1:2000) e anti-goat para E<sub>2</sub> e elF4G (Santa Cruz Biotechnology, diluição 1:2000). A reação de quimioluminescência foi realizada utilizando-se reagente quimioluminescente SuperSignal West Pico (Thermo Fisher Scientific). A análise densitométrica da banda protéica foi feita utilizando-se software

Image Capture (Amershan) e analisados segundo software Gel Pro II (Media Cybernetics).

# 3.6. Análise de hormônios e vias de sinalização

A análise da concentração dos hormônios GH, ACTH e IGF-1 e das proteínas sinalizadoras IRS-1 (total e fosforilada), Stat-3 (total e fosforilada), Stat-6 (fosforilada), Jnk (total e fosforilada), Erk (total e fosforilada), Akt (total e fosforilada), p70S6K (total e fosforilada) foi realizada utilizando-se *beads* conjugadas com anticorpos de captura específicos para cada proteína de interesse.

Amostras de plasma (GH, ACTH e IGF-1) ou sobrenadante do homogeneizado de músculo gastrocnêmio (análise das demais proteínas de sinalização celular, descritas acima) foram aplicadas aos poços de placas multipoços, nas quais haviam sido aplicados, previamente, beads conjugadas com anticorpos contra as proteínas de interesse. A placa foi mantida overnight sob agitação e 4 °C e, após esse período, foi aplicado vácuo para que o material não acoplado às beads fosse eliminado. Seguiu-se com duas lavagens com tampão fornecido pelo fabricante (Millipore) e novamente aplicação de vácuo para remoção do tampão. Adicionou-se, então, biotina aos poços e a placa ficou sob agitação por 30 minutos a temperatura ambiente. Novamente aplicouse vácuo e posteriormente adicionou-se estreptavidina conjugada com ficoeritrina, seguindo-se com incubação sob agitação e a temperatura ambiente por 30 minutos. Após esse período, a estreptavidina conjugada com ficoeritrina não foi removida e foi adicionado tampão de amplificação fornecido pelo fabricante e nova incubação, sob agitação e a temperatura ambiente, por 15 minutos. Em seguida, as placas foram colocadas no equipamento Luminex® para detecção de fluorescência emitida pelas amostras. A análise foi feita segundo software XPonent, utilizado com o equipamento Luminex®.

## 3.7. Ensaio de síntese e degradação protéica

O músculo gastrocnêmio esquerdo de cada animal foi dissecado e colocado em tubos de perfusão com tampão Krebs-Hanseleits (KHB) e incubado a 37 °C com agitação contínua e gaseamento com 95% de 0<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub> (VARY *et al.*, 1998; FEDELE *et al.*, 2001).

Os músculos foram previamente incubados, por 30 minutos, e após esse período foi adicionado novo tampão KHB suplementado com solução de fenilalanina (75 μmol de fenilalanina e 5 μCi de L-[2,6-3H]fenilalanina/mL, Amershan). Ao final de 2 horas de incubação, os músculos foram retirados do meio, secados, pesados, congelados em nitrogênio líquido e guardados a –20 °C. O meio de incubação foi estocado, também, a –20 °C para posterior determinação de fenilalanina marcada.

Os músculos foram homogeneizados em TCA a 30%, seguido de centrifugação a 10.000 x g por 15 minutos a 4 °C. O *pellet* foi lavado duas vezes com TCA 10% para eliminar a radioatividade do sobrenadante. O *pellet* final foi ressuspendido em NaOH 1N e incubado a 40 °C por 30 minutos. Alíquotas foram analisadas quanto ao teor de proteína (BRADFORD, 1976) e medida radioatividade com líquido de cintilação em contador  $\beta$  (LS 6000TA Beckman Coulter). A taxa de síntese protéica foi calculada dividindo-se a concentração de fenilalanina incorporada no precipitado protéico pela radioatividade da fenilalanina no meio de incubação. A síntese protéica foi expressa em

contagem de radioatividade por minuto (CPM) de fenilalanina incorporada por miligrama de proteína por hora.

Músculo gastrocnêmio contralateral foi utilizado para análise da degradação protéica, expressa em unidades de fluorescência de tirosina por miligramas de proteína por hora. A liberação de tirosina foi medida na solução de incubação do músculo, segundo método descrito por LORITE e colaboradores (1998). O músculo foi previamente incubado por 30 minutos a 37 °C com meio RPMI 1670 sem fenol, após este período o músculo foi incubado com solução KHB acrescido de cicloheximida 0.5 mM por 2 horas a 37 °C, gaseado com 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de O<sub>2</sub>. Após este período, uma alíquota do meio de incubação foi precipitada com TCA 30% seguido por centrifugação a 10.000 x g por 10 minutos. A dosagem de tirosina do sobrenadante foi medida fluorimetricamente segundo método de WAALKES & UDENFRIEND (1957), utilizando-se reagente 1-nitroso-2-naphthol e ácido nítrico 20%.

A relação entre a taxa de síntese protéica (incorporação de fenilalanina) e degradação protéica (liberação de tirosina) no músculo gastrocnêmio foi realizada para demosntrar o *turnover* protéico.

#### 3.8. Análise estatística

Utilizou-se o software GraphPad Prism 3.0 (GraphPad Software), utilizando-se das médias e erro padrão das médias e comparação dos múltiplos grupos por análise de variância (ANOVA), seguido do teste de Bonferroni para detecção de diferenças significativas entre os grupos, para probabilidade menor que 5% (GAD & WEIL, 1994).

## **4. RESULTADOS**

# 4.1. Parâmetros Somáticos

Para analisarmos se o tratamento com metformina (36 mg por quilo de peso) foi eficiente, foi realizada a dosagem do glicogênio hepático. Como observado na Figura 5, a concentração de glicogênio hepático nos animais do grupo CM foi, aproximadamente, 65% maior que nos animais do grupo C, indicando que a concentração de metformina foi eficaz.



**Figura 5:** Concentração de glicogênio hepático. Legenda: C, ratos submetidos à dieta normoprotéica; CM, ratos submetidos à dieta normoprotéica tratados com metformina; Resultados expressos como média e erro padrão da média. Número de animais igual a 7 para o grupo C e 10 para o grupo CM. Tratamento com metformina: 36 mg x Kg<sup>-1</sup>. \* p<0,05 em relação a C.

Para analisarmos os efeitos caquéticos que o desenvolvimento neoplásico promove nos animais e se o tratamento com metformina e/ou suplementação nutricional com leucina melhoraram ou não o quadro de caquexia, analisamos alguns parâmetros somáticos como o peso da carcaça e o peso relativo de coração, fígado, baço, glândula adrenal, gordura perirrenal e inguinal e músculo gastrocnêmio.

O peso da carcaça apresentou-se diminuído em todos os grupos portadores de tumor. Os animais dos grupos W, LW e WM apresentaram peso da carcaça, aproximadamente, 18% menores que os animais do grupo C, sendo que os animais do grupo LWM apresentaram diminuição menos pronunciada, já que a redução foi de 14% quando comparados à média dos pesos da carcaça dos animais do grupo C (Figura 6).

Entre os grupos não portadores de tumor (C, L, CM e LM) não houve variação no peso da carcaça e todos os grupos apresentaram pesos muito semelhantes aos do grupo C (Figura 6).



**Figura 6:** Peso da carcaça nos diferentes grupos experimentais. Legenda: C, ratos submetidos à dieta normoprotéica; W, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta normoprotéica; L, ratos submetidos à dieta rica em leucina; CM, ratos submetidos à dieta normoprotéica tratados com metformina; LM, ratos submetidos à dieta rica em leucina tratados com metformina; LW, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta normoprotéica e tratados com metformina; LW, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta rica em leucina; WM, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta rica em leucina e tratados com metformina. Resultados expressos como média e erro padrão da média. Número de animais igual a 16 para os grupos C, W, L, CM, LM, LW e WM e 14 para o grupo LWM; Tratamento com metformina: 36 mg x Kg<sup>-1</sup>.Dieta com excesso de 3% de leucina. \* p<0,05 em relação a C; \*\* p<0,001 em relação a C.

O peso relativo do coração não foi alterado pela presença do tumor e também

não foi alterado pela presença de tratamento com metformina e ou leucina (Figura 7).



**Figura 7:** Peso relativo do coração em relação à carcaça nos diferentes grupos experimentais. Legenda: C, ratos submetidos à dieta normoprotéica; W, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta normoprotéica; L, ratos submetidos à dieta rica em leucina; CM, ratos submetidos à dieta normoprotéica tratados com metformina; LM, ratos submetidos à dieta rica em leucina tratados com metformina; LW, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta rica em leucina; WM, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta rica em leucina; WM, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta rica em leucina e tratados com metformina. Resultados expressos como média e erro padrão da média. Número de animais igual a 16 para os grupos C, W, L, CM, LM, LW e WM e 14 para o grupo LWM; Tratamento com metformina: 36 mg x Kg<sup>-1</sup>.Dieta com excesso de 3% de leucina.

O peso relativo do fígado apresentou-se muito aumentado nos animais dos grupos portadores de tumor. Os animais dos grupos W e LWM apresentaram peso médio, aproximadamente, 20% maior que os animais do grupo C, enquanto que nos animais do grupo LW o aumento do peso relativo médio do fígado foi de 25%, quando comparado ao grupo C (Figura 8). Dos grupos portadores de tumor, o que apresentou aumento menos pronunciado foi o grupo WM, já que o aumento foi de, aproximadamente, 11% em relação ao grupo C (Figura 8).

O peso relativo médio do fígado dos animais pertencentes aos grupos não portadores de tumor (C, L, CM e LM) não apresentaram variação, sendo que todos apresentaram pesos relativos muito semelhantes ao grupo C, com pode ser observado na Figura 8.



**Figura 8:** Peso relativo do fígado em relação à carcaça nos diferentes grupos experimentais. Legenda: C, ratos submetidos à dieta normoprotéica; W, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta normoprotéica tratados com metformina; LM, ratos submetidos à dieta rica em leucina; CM, ratos submetidos à dieta normoprotéica tratados com metformina; LM, ratos submetidos à dieta rica em leucina tratados com metformina; LW, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta rica em leucina; WM, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta rica em leucina; WM, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta rica em leucina; WM, ratos portadores do tumor de Walker submetidos à dieta rica em leucina e tratados com metformina. Resultados expressos como média e erro padrão da média. Número de animais igual a 16 para os grupos C, W, L, CM, LM, LW e WM e 14 para o grupo LWM. Tratamento com metformina: 36 mg x Kg<sup>-1</sup>.Dieta com excesso de 3% de leucina. \* p<0,05 em relação a C; \*\* p<0,01 em relação a C;

O peso relativo do baço apresentou-se muito aumentado em todos os grupos portadores de tumor (Figura 9). Nos grupos W e WM, o peso relativo médio do baço foi 110% maior do que o observado nos animais do grupo que C, enquanto que no grupo LW foi cerca de 120% maior que no grupo C (Figura 9). Nos animais do grupo LWM esse aumento foi cerca de 140% em comparação ao grupo C (Figura 9).

Não houve alteração estatisticamente significativa no peso relativo médio do baço em relação à carcaça entre os grupos portadores de tumor (Figura 9). Os grupos não portadores de tumor também não apresentaram variação estatisticamente significativa nesse parâmetro (Figura 9)


**Figura 9**: Peso relativo do baço em relação à carcaça nos diferentes grupos experimentais. Legenda: C, ratos submetidos à dieta normoprotéica; W, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta normoprotéica; L, ratos submetidos à dieta rica em leucina; CM, ratos submetidos à dieta normoprotéica tratados com metformina; LM, ratos submetidos à dieta rica em leucina tratados com metformina; LW, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta rica em leucina; WM, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta normoprotéica e tratados com metformina; LWM, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta rica em leucina; WM, ratos portadores do tumor de Walker submetidos à dieta rica em leucina e tratados com metformina. Resultados expressos como média e erro padrão da média. Número de animais igual a 16 para os grupos C, W, L, CM, LM, LW e WM e 14 para o grupo LWM. Tratamento com metformina: 36 mg x Kg<sup>-1</sup>.Dieta com excesso de 3% de leucina. \*\*\* p<0,001 em relação a C.

O peso relativo da glândula adrenal apresentou-se aumentado em todos os grupos portadores de tumor (W, LW e WM foram, aproximadamente, 75% maior que C; LWM foi 50% maior que o grupo C) (Figura 10).



**Figura 10:** Peso relativo da glândula adrenal em relação à carcaça nos diferentes grupos experimentais. Legenda: C, ratos submetidos à dieta normoprotéica; W, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta normoprotéica; L, ratos submetidos à dieta rica em leucina; CM, ratos submetidos à dieta normoprotéica tratados com metformina; LM, ratos submetidos à dieta rica em leucina tratados com metformina; LW, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta rica em leucina; WM, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta rica em leucina; WM, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta normoprotéica e tratados com metformina; LWM, ratos portadores do tumor de Walker submetidos à dieta rica em leucina e tratados com metformina. Resultados expressos como média e erro padrão da média. Número de animais igual a 16 para os grupos C, W, L, CM, LM, LW e WM e 14 para o grupo LWM. Tratamento com metformina: 36 mg x Kg<sup>-1</sup>.Dieta com excesso de 3% de leucina.\*\* p<0,01 em relação a C. \*\*\* p<0,001 em relação a C

O peso relativo da gordura perirrenal apresentou-se bastante diminuído em todos os grupos portadores de tumor (Figura 11). O grupo W mostrou redução de cerca de 70% em relação ao grupo C, enquanto que nos grupos portadores de tumor submetidos à dieta com excesso de 3% de leucina (LW e LWM) houve redução de 60% no peso relativo da gordura perirrenal, quando comparados ao grupo C (Figura 11). No grupo portador de tumor tratado com metformina (WM) também houve redução na porcentagem de gordura perirrenal, porém essa redução foi menos intensa. Os animais do apresentaram peso relativo médio gordura perirrenal, grupo WM da aproximadamente, 65% menor que C (Figura 11).

Embora não tenha ocorrido diferença estatisticamente significativa entre os grupos não portadores de tumor, os grupos tratados com metformina apresentaram tendência de diminuição do peso relativo da gordura perirrenal, sendo que essa redução foi de, aproximadamente, 20% no grupo CM em relação ao grupo C e de, aproximadamente, 7% no grupo LM em relação ao grupo C (Figura 11).



**Figura 11:** Peso relativo da gordura perirrenal em relação à carcaça nos diferentes grupos experimentais. Legenda: C, ratos submetidos à dieta normoprotéica; W, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta normoprotéica; L, ratos submetidos à dieta rica em leucina; CM, ratos submetidos à dieta normoprotéica tratados com metformina; LM, ratos submetidos à dieta rica em leucina tratados com metformina; LW, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta rica em leucina; WM, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta rica et ratados com metformina; LWM, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta rica em leucina; WM, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta rica em leucina et tratados com metformina. Resultados expressos como média e erro padrão da média. Número de animais igual a 16 para os grupos C, W, L, CM, LM, LW e WM e 14 para o grupo LWM. Tratamento com metformina: 36 mg x Kg<sup>-1</sup>.Dieta com excesso de 3% de leucina. \*\*\* p<0,001 em relação a C.

O peso relativo da gordura inguinal também foi muito diminuído em todos os grupos portadores de tumor, sendo que nos grupos W, LW e LWM essa redução foi de, aproximadamente, 60% enquanto que no grupo WM foi de 50%, quando comparados ao grupo C (Figura 12).

Entre os animais não portadores de tumor não houve variação estatisticamente significativa. Porém, o grupo CM apresentou redução de 5% em relação ao grupo C (Figura 12).



**Figura 12:** Peso relativo da gordura inguinal em relação à carcaça nos diferentes grupos experimentais. Legenda: C, ratos submetidos à dieta normoprotéica; W, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta normoprotéica; L, ratos submetidos à dieta rica em leucina; CM, ratos submetidos à dieta normoprotéica tratados com metformina; LM, ratos submetidos à dieta rica em leucina tratados com metformina; LW, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta rica em leucina; WM, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta normoprotéica e tratados com metformina; LWM, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta normoprotéica e tratados com metformina; LWM, ratos portadores do tumor de Walker submetidos à dieta rica em leucina e tratados com metformina. Resultados expressos como média e erro padrão da média. Número de animais igual a 16 para os grupos C, W, L, CM, LM, LW e WM e 14 para o grupo LWM. Tratamento com metformina: 36 mg x Kg<sup>-1</sup>.Dieta com excesso de 3% de leucina. \* p<0,05 em relação a C; \*\* p<0,001 em relação a C.

O peso relativo do músculo gastrocnêmio foi reduzido em todos os grupos portadores de tumor , porém essa redução foi menor nos animais tratados com metformina e/ou leucina. O grupo W apresentou redução de 20% do peso relativo médio do músculo gastrocnêmio quando comparado ao grupo C, enquanto que os animais dos grupos LW, WW e LWM apresentaram redução de 15%, quando comparados ao grupo C (Figura 13). Porém não houve variação estatisticamente significativa entre as diferenças encontradas entre os grupos portadores de tumor que receberam algum tratamento (metformina e/ou leucina) quando comparados aos animais do grupo W. (Figura 13). De maneira semelhante, não houve variação no peso relativo médio do músculo gastrocnêmio entre os grupos não portadores de tumor (Figura 13).



**Figura 13:** Peso relativo do músculo gastrocnêmio em relação à carcaça nos diferentes grupos experimentais. Legenda: C, ratos submetidos à dieta normoprotéica; W, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta normoprotéica; L, ratos submetidos à dieta rica em leucina; CM, ratos submetidos à dieta normoprotéica tratados com metformina; LM, ratos submetidos à dieta rica em leucina tratados com metformina; LW, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta rica em leucina; WM, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta rica e tratados com metformina; LW, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta rica e tratados com metformina; LWM, ratos portadores do tumor de Walker submetidos à dieta rica em leucina e tratados com metformina. Resultados expressos como média e erro padrão da média. Número de animais igual a 16 para os grupos C, W, L, CM, LM, LW e WM e 14 para o grupo LWM. Tratamento com metformina: 36 mg x Kg<sup>-1</sup>.Dieta com excesso de 3% de leucina. \*\* p<0,01 em relação a C; \*\*\*

O peso relativo do tumor em relação à carcaça não foi alterado nos diferentes grupos experimentais (Figura 14).



**Figura 14:** Peso relativo do tumor em relação à carcaça nos diferentes grupos experimentais. Legenda: W, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta normoprotéica; LW, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta normoprotéica e tratados com metformina; LWM, ratos portadores do tumor de Walker submetidos à dieta normoprotéica e tratados com metformina; LWM, ratos portadores do tumor de Walker submetidos à dieta normoprotéica e tratados com metformina; LWM, ratos portadores do tumor de Walker submetidos à dieta rica em leucina e tratados com metformina. Resultados expressos como média e erro padrão da média. Número de animais igual a 16 para os grupos C, W, L, CM, LM, LW e WM e 14 para o grupo LWM. Tratamento com metformina: 36 mg x Kg<sup>-1</sup>.Dieta com excesso de 3% de leucina.

## 4.2. Parâmetros Séricos e Teciduais

Parâmetros séricos (concentração de glicose, proteínas totais, albumina, globulinas, GH, IGF-1 e ACTH) e teciduais (concentração de proteína e taxa de síntese e degradação protéica no músculo gastrocnêmio) foram analisados para avaliar o estado caquético dos animais portadores de tumor.

A concentração sérica de glicose foi muito diminuída em todos os grupos portadores de tumor, sendo que nos grupos W e WM essa redução foi de, aproximadamente, 50% enquanto que nos grupos LW e LWM a redução foi de 40%, quando comparados ao grupo C (Figura 15). Embora a concentração de glicose nos grupos LW e LWM tenham sido aproximadamente 20% maiores que no grupo W, essa diferença não foi estatisticamente significativa (Figura 15).

A concentração sérica de glicose não foi alterada nos grupos não portadores de tumor, independentemente do tratamento com metformina e/ou suplementação com leucina (Figura 15).



**Figura 15:** Concentração sérica de glicose nos diferentes grupos experimentais. Legenda: C, ratos submetidos à dieta normoprotéica; W, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta normoprotéica; L, ratos submetidos à dieta rica em leucina; CM, ratos submetidos à dieta normoprotéica tratados com metformina; LM, ratos submetidos à dieta rica em leucina tratados com metformina; LW, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta rica em leucina; WM, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta normoprotéica e tratados com metformina; LWM, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta normoprotéica e tratados com metformina; LWM, ratos portadores do tumor de Walker submetidos à dieta rica em leucina e tratados com metformina. Resultados expressos como média e erro padrão da média. Número de animais igual a 8 para os grupos C, W, L, CM, LM, e WM e 7 para os grupos LW e LWM. Tratamento com metformina: 36 mg x Kg<sup>-1</sup>.Dieta com excesso de 3% de leucina. \*\*\* p<0,001 em relação a C.

A concentração sérica de proteínas totais apresentou-se diminuída aproximadamente 20% em todos os grupos portadores de tumor quando comparados ao grupo C, já os grupos não portadores de tumor não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre si (Figura 16).



**Figura 16:** Concentração sérica de proteínas totais nos diferentes grupos experimentais. Legenda: C, ratos submetidos à dieta normoprotéica; W, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta normoprotéica; L, ratos submetidos à dieta rica em leucina; CM, ratos submetidos à dieta normoprotéica tratados com metformina; LM, ratos submetidos à dieta rica em leucina tratados com metformina; LW, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta rica em leucina; WM, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta normoprotéica e tratados com metformina; LWM, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta normoprotéica e tratados com metformina; LWM, ratos portadores do tumor de Walker submetidos à dieta rica em leucina e tratados com metformina. Resultados expressos como média e erro padrão da média. Número de animais igual a 8 para os grupos C, W, L, CM, LM, e WM e 7 para os grupos LW e LWM. Tratamento com metformina: 36 mg x Kg<sup>-1</sup>.Dieta com excesso de 3% de leucina. \*\*\* p<0,001 em relação a C.

A concentração sérica de albumina apresentou-se diminuída aproximadamente 25% em todos os grupos portadores de tumor, quando comparados ao grupo C (Figura 17). Os grupos não portadores de tumor não apresentaram variação na concentração sérica de albumina, como pode ser observado na Figura 17.



**Figura 17:** Concentração sérica de albumina nos diferentes grupos experimentais. Legenda: C, ratos submetidos à dieta normoprotéica; W, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta normoprotéica; L, ratos submetidos à dieta rica em leucina; CM, ratos submetidos à dieta normoprotéica tratados com metformina; LM, ratos submetidos à dieta rica em leucina tratados com metformina; LW, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta rica em leucina; WM, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta normoprotéica e tratados com metformina; LWM, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta normoprotéica e tratados com metformina; LWM, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta normoprotéica e tratados com metformina; LWM, ratos portadores do tumor de Walker submetidos à dieta rica em leucina e tratados com metformina. Resultados expressos como média e erro padrão da média. Número de animais igual a 8 para os grupos C, W, L, CM, LM e WM e 7 para os grupos LW e LWM. Tratamento com metformina: 36 mg x Kg<sup>-1</sup>.Dieta com excesso de 3% de leucina. \*\*\* p<0,001 em relação a C.

A concentração sérica de globulinas apresentou-se diminuída em todos os grupos portadores de tumor. Porém, como pode ser observado na Figura 18, essa diminuição foi estatisticamente significativa apenas no grupo W, quando comparado ao grupo C, sendo que W foi, aproximadamente, 15% menor que C. Entre os grupos portadores de tumor, não houve variação estatisticamente significativa quando comparados ao grupo W (Figura 18). De maneira semelhante, entre os grupos não portadores de tumor, não houve variação estaticamente significativa quando comparados ao grupo C (Figura 18).



**Figura 18:** Concentração sérica de globulinas nos diferentes grupos experimentais. Legenda: C, ratos submetidos à dieta normoprotéica; W, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta normoprotéica; L, ratos submetidos à dieta rica em leucina; CM, ratos submetidos à dieta normoprotéica tratados com metformina; LM, ratos submetidos à dieta rica em leucina tratados com metformina; LW, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta rica em leucina; WM, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta rica em leucina; WM, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta rica em leucina e tratados com metformina; LWM, ratos portadores do tumor de Walker submetidos à dieta rica em leucina e tratados com metformina. Resultados expressos como média e erro padrão da média. Número de animais igual a 8 para os grupos C, W, L, CM, LM e WM e 7 para os grupos LW e LWM. Tratamento com metformina: 36 mg x Kg<sup>-1</sup>.Dieta com excesso de 3% de leucina.\*\* p<0,01 em relação a C.

Embora as variações na concentração de GH não tenham sido estatisticamente significativas, é possível observar que, com exceção do grupo LWM, os grupos portadores de tumor apresentaram concentrações de GH menores que os grupos não portadores de tumor (Figura 19). A concentração de GH no grupo W foi reduzida em 50%, quando comparado ao grupo C, enquanto que no grupo LW e WM essa redução foi de 80% e 70%, respectivamente, quando comparados ao grupo C. A concentração de GH no grupo LWM foi aumentada em, aproximadamente, 80% quando comparado ao grupo C (Figura 19).

Dentre os grupo não portadores de tumor também houve variação na concentração de GH, sendo que o grupo L teve aumento de 80% quando comparado ao grupo C, enquanto que no grupo CM o aumento foi de 20% quando comparado ao grupo C. O grupo LM, quando comparado ao grupo L, apresentou aumento de 40% na concentração de GH (Figura 19).



**Figura 19:** Concentração de GH sérico nos diferentes grupos experimentais. Legenda: C, ratos submetidos à dieta normoprotéica; W, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta normoprotéica; L, ratos submetidos à dieta rica em leucina; CM, ratos submetidos à dieta normoprotéica tratados com metformina; LM, ratos submetidos à dieta rica em leucina tratados com metformina; LW, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta rica em leucina; WM, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta normoprotéica e tratados com metformina; LWM, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta normoprotéica e tratados com metformina; LWM, ratos portadores do tumor de Walker submetidos à dieta rica em leucina e tratados com metformina. Resultados expressos como média e erro padrão da média. Número de animais igual a 3 por grupo. Tratamento com metformina: 36 mg x Kg<sup>-1</sup>.Dieta com excesso de 3% de leucina

A concentração de IGF-1 teve padrão similar ao observado na concentração de GH, tendo em vista que o GH tem efeitos fisiológicos diretos e indiretos mediados pelo fator de crescimento semelhante a insulina – IGF-1.

A concentração de IGF-1 apresentou-se muito diminuída em todos os grupos portadores de tumor (cerca de 90% menor no W, 95% nos grupos LW e WM e 85% no LWM em relação ao grupo C), como pode ser observado na Figura 20.

Dos grupos não portadores de tumor, apenas o grupo CM apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo C (CM foi 45% menor que o grupo C) (Figura 20). Porém, a concentração de IGF-1 foi reduzida em 14% no grupo L, quando comparada ao grupo C. No grupo LM a redução foi de, aproximadamente, 30%, quando comparado ao grupo L (Figura 20).



**Figura 20:** Concentração sérica de IGF-1 nos diferentes grupos experimentais. Legenda: C, ratos submetidos à dieta normoprotéica; W, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta normoprotéica; L, ratos submetidos à dieta rica em leucina; CM, ratos submetidos à dieta normoprotéica tratados com metformina; LM, ratos submetidos à dieta rica em leucina tratados com metformina; LW, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta rica em leucina; WM, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta normoprotéica e tratados com metformina; LWM, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta normoprotéica e tratados com metformina; LWM, ratos portadores do tumor de Walker submetidos à dieta rica em leucina e tratados com metformina. Resultados expressos como média e erro padrão da média. Número de animais igual a 10 por grupo. Tratamento com metformina: 36 mg x Kg<sup>-1</sup>.Dieta com excesso de 3% de leucina. \*\* p < 0,01 em relação a C; \*\*\* p < 0,001 em relação a C.

As concentrações de ACTH nos grupos portadores de tumor foram aumentadas em relação ao grupo C (maior em cerca de 90% no W, 100% no LW, 60% no WM, e 16% no LWM em relação ao grupo C), embora essas diferenças não sejam estatisticamente significativas (Figura 21).



**Figura 21:** Concentração de ACTH sérico nos diferentes grupos experimentais. Legenda: C, ratos submetidos à dieta normoprotéica; W, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta normoprotéica; L, ratos submetidos à dieta rica em leucina; CM, ratos submetidos à dieta normoprotéica tratados com metformina; LM, ratos submetidos à dieta rica em leucina tratados com metformina; LW, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta rica em leucina; WM, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta normoprotéica e tratados com metformina; LWM, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta normoprotéica e tratados com metformina; LWM, ratos portadores do tumor de Walker submetidos à dieta rica em leucina e tratados com metformina. Resultados expressos como média e erro padrão da média. Número de animais igual a 3 por grupo. Tratamento com metformina: 36 mg x Kg<sup>-1</sup>.Dieta com excesso de 3% de leucina.

A concentração de proteína no músculo gastrocnêmio não foi estatisticamente diferente entre os grupos experimentais (Figura 22). Porém, o grupo W apresentou 5% de redução na concentração de proteína quando comparado ao grupo C. Os grupos LW e WM apresentaram 4% e 5% de aumento, respectivamente, na concentração de proteína muscular quando comparados ao grupo W (Figura 22).

Dentre os grupo não portadores de tumor houve aumento na concentração de proteína no musculo gastrocnêmio nos grupos CM e LM. O grupo CM foi 10% maior que o grupo C, enquanto que o grupo LM foi 5% maior que C. O grupo LM também apresentou variação na concentração de proteína muscular quando comparado ao grupo L, sendo que LM foi 4% (Figura 22).



**Figura 22**: Concentração de proteína no músculo gastrocnêmio nos diferentes grupos experimentais. Legenda: C, ratos submetidos à dieta normoprotéica; W, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta normoprotéica; L, ratos submetidos à dieta rica em leucina; CM, ratos submetidos à dieta normoprotéica tratados com metformina; LM, ratos submetidos à dieta rica em leucina tratados com metformina; LW, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta rica em leucina; WM, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta normoprotéica e tratados com metformina; LWM, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta rica em leucina e tratados com metformina. Resultados expressos como média e erro padrão da média. Número de animais igual a 8 para os grupos C, W, L, CM, LM e WM e 7 para os grupos LW e LWM. Tratamento com metformina: 36 mg x Kg<sup>-1</sup>.Dieta com excesso de 3% de leucina.

Embora a concentração de tirosina liberada no meio de incubação tenha sido maior em todos os grupos portadores de tumor, com exceção do grupo LWM, esse aumento não foi estatisticamente significativo (Figura 23). Os grupos W, LW e WM foram cerca de 40% maior que o grupo C, enquanto que o grupo LWM foi cerca de 30% maior que C (Figura 23).

Os grupos não portadores de tumor tiveram aumento de, aproximadamente, 20% na concentração de tirosina liberada para o meio de incubação, quando comparados ao grupo C (Figura 23).



**Figura 23**: Concentração de tirosina no meio de incubação nos diferentes grupos experimentais. Legenda: C, ratos submetidos à dieta normoprotéica; W, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta normoprotéica; L, ratos submetidos à dieta rica em leucina; CM, ratos submetidos à dieta normoprotéica tratados com metformina; LM, ratos submetidos à dieta rica em leucina tratados com metformina; LW, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta rica em leucina; WM, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta normoprotéica e tratados com metformina; LWM, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta rica em leucina e tratados com metformina. Resultados expressos como média e erro padrão da média. Número de animais igual a 8 por grupo. Tratamento com metformina: 36 mg x Kg<sup>-1</sup>.Dieta com excesso de 3% de leucina.

Embora a diferença na concentração de fenilalanina marcada com trício incorporada no músculo gastrocnêmio não tenha sido estatisticamente significativa entre os grupos experimentais, é possível observar aumento de 230% desse aminoácido no músculos dos animais do grupo L quando comparados aos animais do

grupo C (Figura 24), e também nos outros grupos suplementadas com leucina observou-se tendência ao aumento da incorporação de fenialanina, sendo que LM foi 60% maior que C.

Entre os grupos portadores de tumor, como pode ser observado na Figura 24, o grupo LW apresentou taxa de incorporação de fenilalanina 90% maior que o grupo C e cerca de 130% maior que o grupo W.



**Figura 24:** Concentração de fenilalanina no músculo gastrocnêmio nos diferentes grupos experimentais. Legenda: C, ratos submetidos à dieta normoprotéica; W, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta normoprotéica; L, ratos submetidos à dieta rica em leucina; CM, ratos submetidos à dieta normoprotéica tratados com metformina; LM, ratos submetidos à dieta rica em leucina tratados com metformina; LW, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta rica em leucina; WM, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta normoprotéica e tratados com metformina; LWM, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta rica em leucina; WM, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta rica em leucina e tratados com metformina. Resultados expressos como média e erro padrão da média. Número de animais igual a 8 por grupo. Tratamento com metformina: 36 mg x Kg<sup>-1</sup>.Dieta com excesso de 3% de leucina.

A razão entre síntese protéica (representada como incorporação de fenilalanina no músculo gastrocnêmio) e degradação (representada como liberação de tirosina no meio de incubação no qual o músculo gastrocnêmio foi imerso), em relação ao grupo controle, mostrou que os animais portadores de tumor apresentaram redução do *turnover* protéico. Porém, essa diminuição foi mais pronunciada no grupo W, sendo

aproximadamente 90% menor que o grupo C. Com relação aos grupos não portadores de tumor, verificou-se que houve expressivo aumento do balanço protéico no grupo L, sendo aproximadamente 115% maior que no grupo C, como pode ser observado na Figura 25.



**Figura 25:** Razão entre síntese e degradação protéica no músculo gastrocnêmio nos diferentes grupos experimentais. Legenda: C, ratos submetidos à dieta normoprotéica; W, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta normoprotéica; L, ratos submetidos à dieta rica em leucina; CM, ratos submetidos à dieta normoprotéica tratados com metformina; LM, ratos submetidos à dieta rica em leucina tratados com metformina; LW, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta normoprotéica e tratados com metformina; LW, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta normoprotéica e tratados com metformina; LWM, ratos portadores do tumor de Walker submetidos à dieta rica em leucina e tratados com metformina. Resultados expressos como média e erro padrão da média. Número de animais igual a 8 por grupo. Tratamento com metformina: 36 mg x Kg<sup>-1</sup>.Dieta com excesso de 3% de leucina.

## 4.3. Vias de Sinalização Celulares

A concentração de IRS-1 total foi bastante alterada em todos os grupos portadores de tumor, quando comparados ao grupo C (W e LW foram 85% menor; WM e LWM foram 90% menor). Embora o tratamento com metformina tenha diminuído a concentração de IRS-1 total nos grupos não portadores de tumor (CM e LM), essa diferença não foi estatisticamente significativa (Figura 26A). Embora tenha ocorrido diminuição na concentração de IRS-1 fosforilada nos grupos W e, principalmente LWM, essa diminuição não foi estatisticamente significativa (Figura 26B).

A relação entre IRS-1 fosforilada e IRS-1 total foi bastante aumentada em todos os grupos portadores de tumor, com exceção do grupo (LWM 4,6 vezes maior que C; LW foi 5.6 vezes maior que C; WM foi 11,6 maior que C) (Figura 26C).



**Figura 26**: (A) concentração de IRS-1 total, (B) concentração de IRS-1 fosforilada e (C) relação entre as concentrações de IRS-1 fosforilada e IRS-1 total no músculo gastrocnêmio nos diferentes grupos experimentais. Legenda: C, ratos submetidos à dieta normoprotéica; W, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta normoprotéica; L, ratos submetidos à dieta rica em leucina; CM, ratos submetidos à dieta normoprotéica tratados com metformina; LM, ratos submetidos à dieta rica em leucina tratados com metformina; LW, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta rica em leucina; WM, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta rica em leucina; WM, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta rica em leucina e tratados com metformina. Resultados expressos como média e erro padrão da média. Figura C: resultados expressos como relação entre a média dos valores da proteína fosforilada pela média da proteína total. Número de animais igual a 8 por grupo. Tratamento com metformina: 36 mg x Kg<sup>-1</sup>.Dieta com excesso de 3% de leucina.\* p<0.05 em relação ao grupo C.

As diferenças na concentração de Stat-3 total (*signal transducer and activator of transcription 3*) não foram estatisticamente significativas (Figura 27A), embora haja tendência ao aumento nos grupos sem tumor (L, CM e LM) e também nos grupos com tumor, principalmente nos W e LWM. Com padrão similar, observou-se que a concentração de Stat-3 fosforilada não apresentou alteração estatisticamente significativa entre os grupos experimentais (Figura 27B), embora haja tendência ao aumento nos grupos sem tumor (L, CM e LM) e no grupo com tumor LW.

A relação entre Stat-3 fosforilada e Stat-3 total também não apresentou alteração estatisticamente significativa entre os grupos experimentais (Figura 27C).



**Figura 27:** (A) concentração de Stat-3 total, (B) concentração de Stat-3 fosforilada e (C) relação entre Stat-3 fosforilada e Stat-3 total no músculo gastrocnêmio nos diferentes grupos experimentais. Legenda: C, ratos submetidos à dieta normoprotéica; W, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta normoprotéica; L, ratos submetidos à dieta rica em leucina; CM, ratos submetidos à dieta normoprotéica tratados com metformina; LM, ratos submetidos à dieta rica em leucina tratados com metformina; LW, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta rica em leucina; WM, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta rica em leucina; LWM, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta rica em leucina e tratados com metformina. Resultados expressos como média e erro padrão da média. Figura C: resultados expressos como a relação entre a média dos valores da proteína fosforilada pela média da proteína total. Número de animais igual a 8 por grupo. Tratamento com metformina: 36 mg x Kg<sup>-1</sup>.Dieta com excesso de 3% de leucina.

Embora a concentração de Stat-6 fosforilada (*signal transducer and activator of transcription 6,* induzido por interleucina 4) tenha sido aumentada nos grupos W e LW, quando comparados ao grupo C, essa diferença não foi estatisticamente significativa (Figura 28).



**Figura 28:** concentração de Stat-6 fosforilada no músculo gastrocnêmio nos diferentes grupos experimentais. Legenda: C, ratos submetidos à dieta normoprotéica; W, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta normoprotéica; L, ratos submetidos à dieta rica em leucina; CM, ratos submetidos à dieta normoprotéica tratados com metformina; LM, ratos submetidos à dieta rica em leucina tratados com metformina; LW, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta rica em leucina; WM, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta rica em leucina; WM, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta normoprotéica e tratados com metformina; LWM, ratos portadores do tumor de Walker submetidos à dieta rica em leucina e tratados com metformina. Resultados expressos como média e erro padrão da média. Número de animais igual a 8 por grupo. Tratamento com metformina: 36 mg x Kg<sup>-1</sup>.Dieta com excesso de 3% de leucina.

A concentração de Jnk total (*c-Jun N-terminal kinase*) não foi significativamente alterada nos grupos experimentais (Figura 29A). Porém, tendeu a ser reduzida nos grupos com leucina e metformina (LM e LWM). O grupo LM foi 30% menor quando comparado ao grupo C, 20% menor quando comparado ao grupo L e 15% quando comparado ao grupo CM (Figura 29A). O grupo LWM foi 15% menor quando comparado aos grupos W e LW (Figura 29A).

A concentração de Jnk fosforilada foi ligeiramente menor em todos os grupos quando comparados ao grupo C, porém a diferença não foi estatisticamente significativa (Figura 29B). O grupo LM apresentou redução de 40% quando comparado ao grupo C e de 20% quando comparado ao grupo L (Figura 29B)

A relação entre Jnk fosforilada e JnK total não foi alterada nos diferentes grupos experimentais (Figura 29C).



**Figura 29:** (A) concentração de Jnk total, (B) concentração de Jnk fosforilada e (C) relação entre Jnk fosforilada e Jnk total no músculo gastrocnêmio nos diferentes grupos experimentais. Legenda: C, ratos submetidos à dieta normoprotéica; W, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta normoprotéica; L, ratos submetidos à dieta rica em leucina; CM, ratos submetidos à dieta normoprotéica tratados com metformina; LM, ratos submetidos à dieta rica em leucina tratados com metformina; LW, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta rica em leucina; WM, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta normoprotéica e tratados com metformina; LWM, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta normoprotéica e tratados com metformina; LWM, ratos portadores do tumor de Walker submetidos à dieta rica em leucina e tratados com metformina. Resultados expressos como média e erro padrão da média. Número de animais igual a 8 por grupo. Tratamento com metformina: 36 mg x Kg<sup>-1</sup>.Dieta com excesso de 3% de leucina.

A concentração de Erk total (*extracellular signal-regulated kinase*) apresentou-se diminuída em todos os grupos portadores de tumor, porém apenas nos grupos W e LWM essa diferença foi estatisticamente significativa (sendo menor em cerca de 16% no grupo W e 30% no grupo LWM em relação ao C) (Figura 30A). A concentração de Erk fosforilada apresentou diminuição estatisticamente significativa nos grupos LM e

LWM, quando comparados ao grupo C (cerca de 43% e 54% nos LM e LWM, respectivamente, em relação ao C) (Figura 30B).

A relação entre Erk fosforilada e Erk total foi estatisticamente significativa apenas no grupo LM quando comparado ao grupo C (LM foi cerca de 40% menor que C) (Figura 30C).



**Figura 30:** (A) concentração de Erk Total, (B) concentração de Erk fosforilada e (C) relação entre Erk fosforilada e Erk total no músculo gastrocnêmio nos diferentes grupos experimentais. Legenda: C, ratos submetidos à dieta normoprotéica; W, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta normoprotéica; L, ratos submetidos à dieta rica em leucina; CM, ratos submetidos à dieta normoprotéica tratados com metformina; LM, ratos submetidos à dieta rica em leucina tratados com metformina; LW, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta normoprotéica e tratados com metformina; LW, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta normoprotéica e tratados com metformina; LW, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta normoprotéica e tratados com metformina; LWM, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta normoprotéica e tratados com metformina; LWM, ratos portadores do tumor de Walker submetidos à dieta normoprotéica e tratados com metformina; LWM, ratos portadores do tumor de Walker submetidos à dieta normoprotéica e tratados com metformina; LWM, ratos portadores do tumor de Walker submetidos à dieta rica em leucina e tratados com metformina. Resultados expressos como média e erro padrão da média. Número de animais igual a 8 por grupo. Tratamento com metformina: 36 mg x Kg<sup>-1</sup>.Dieta com excesso de 3% de leucina. \* p < 0,01 em relação a C; § p < 0,01 em relação a W.

A concentração de Akt total (também conhecida como protein kinase B, PKB)

apresentou-se cerca de 70% aumentada no grupo WM quando comparado ao grupo W

(Figura 31A).

A relação entre Akt fosforilada e Akt total foi diminuída nos grupos L, CM e LM quando comparados ao grupo C, porém não houve diferença estatisticamente significativa (Figura 31C). Nos grupos portadores de tumor houve aumento dessa relação, quando comparados ao grupo C, porém apenas no grupo WM, quando comparado ao grupo W, observou-se diferença estatisticamente significativa (WM foi 55% menor que W) (Figura 31C).



**Figura 31:** (A) concentração de Akt total, (B) concentração de Akt fosforilada e (C) relação entre Akt fosforilada e Akt total no músculo gastrocnêmio nos diferentes grupos experimentais. Legenda: C, ratos submetidos à dieta normoprotéica; W, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta normoprotéica tratados com metformina; LM, ratos submetidos à dieta rica em leucina; ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta normoprotéica è dieta normoprotéica è dieta normoprotéica è dieta normoprotéica è dieta rica em leucina; CM, ratos submetidos à dieta normoprotéica tratados com metformina; LM, ratos submetidos à dieta rica em leucina tratados com metformina; LW, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta normoprotéica e tratados com metformina; LWM, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta normoprotéica e tratados com metformina; LWM, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta normoprotéica e tratados com metformina; LMM, ratos portadores do tumor de Walker submetidos à dieta normoprotéica e tratados com metformina; LMM, ratos portadores do tumor de Walker submetidos à dieta normoprotéica e tratados com metformina; LMM, ratos portadores do tumor de Walker submetidos à dieta normoprotéica e tratados com metformina; LMM, ratos portadores do tumor de Walker submetidos à dieta normoprotéica e tratados com metformina. Resultados expressos como média e erro padrão da média. Número de animais igual a 8 por grupo. Tratamento com metformina: 36 mg x Kg<sup>-1</sup>. Dieta com excesso de 3% de leucina. § p < 0,05 em relação a W; §§ p < 0,005 em relação a LM.

A concentração de p70S6K total (p70 Ribossomal S6 kinase) não apresentou-se

alterada entre os diferente grupos experimentais (Figura 32A), tendendo a elevação nos

grupos W e WM. A concentração de p70S6K fosforilada também não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os diferentes grupos experimentais (Figura 32B), mostrando também tendência a elevação no grupo W.

A relação entre p70S6K fosforilada e p70S6K total não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os diferentes grupos experimentais (Figura 32C).



**Figura 32:** (A) concentração de p70S6K total, (B) concentração de p70S6K fosforilada e (C) relação entre p70S6K fosforilada e p70S6K total no músculo gastrocnêmio nos diferentes grupos experimentais. Legenda: C, ratos submetidos à dieta normoprotéica; W, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta normoprotéica; L, ratos submetidos à dieta rica em leucina; CM, ratos submetidos à dieta normoprotéica tratados com metformina; LM, ratos submetidos à dieta rica em leucina tratados com metformina; LW, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta rica em leucina; WM, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta normoprotéica e tratados com metformina; LW, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta normoprotéica e tratados com metformina; LWM, ratos portadores do tumor de Walker submetidos à dieta rica em leucina e tratados com metformina. Resultados expressos como média e erro padrão da média. Tratamento com metformina: 36 mg x Kg<sup>-1</sup>. Dieta com excesso de 3% de leucina. Número de animais igual a 8 por grupo.

A expressão da proteína GADPH foi semelhante em todos os grupos experimentais (Figura 33), correspondendo ao padrão de controle interno e também de mesma concentração de proteína para todos os grupos experimentais.



**Figura 33:** Expressão da proteína GADPH nos diferentes grupos experimentais. Legenda: C, ratos submetidos à dieta normoprotéica; W, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta normoprotéica; L, ratos submetidos à dieta rica em leucina; CM, ratos submetidos à dieta normoprotéica tratados com metformina; LM, ratos submetidos à dieta rica em leucina tratados com metformina; LW, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta rica em leucina; WM, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta normoprotéica e tratados com metformina; LWM, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta normoprotéica e tratados com metformina; LWM, ratos portadores do tumor de Walker submetidos à dieta rica em leucina e tratados com metformina. Resultados expressos como média e erro padrão da média das porcentagens dos grupos em relação ao grupo C. Número de animais por grupo igual a 3. Tratamento com metformina: 36 mg x Kg<sup>-1</sup>.Dieta com excesso de 3% de leucina.

A expressão de eIF4G não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos, apesar do ligeiro aumento verificado nos grupos W, CM, LM e LW (Figura 34).



**Figura 34:** Expressão da proteína elF4G nos diferentes grupos experimentais. Legenda: C, ratos submetidos à dieta normoprotéica; W, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta normoprotéica; L, ratos submetidos à dieta rica em leucina; CM, ratos submetidos à dieta normoprotéica tratados com metformina; LM, ratos submetidos à dieta rica em leucina tratados com metformina; LW, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta normoprotéica e tratados com metformina; LW, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta normoprotéica e tratados com metformina; LWM, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta normoprotéica e tratados com metformina; LWM, ratos portadores do tumor de Walker submetidos à dieta normoprotéica e tratados com metformina; LWM, ratos portadores do tumor de Walker submetidos à dieta rica em leucina e tratados com metformina. Resultados expressos como média e erro padrão da média das porcentagens dos grupos em relação ao grupo C. Número de animais igual a 3 por grupo. Tratamento com metformina: 36 mg x Kg<sup>-1</sup>.Dieta com excesso de 3% de leucina.

A expressão de 4E-BP1 não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos, porém houve tendência de aumento nos grupos LW e WM (Figura 35).



**Figura 35:** Expressão da proteína 4E-BP1 nos diferentes grupos experimentais. Legenda: C, ratos submetidos à dieta normoprotéica; W, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta normoprotéica; L, ratos submetidos à dieta rica em leucina; CM, ratos submetidos à dieta normoprotéica tratados com metformina; LM, ratos submetidos à dieta rica em leucina tratados com metformina; LW, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta rica em leucina; WM, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta rica em leucina; WM, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta rica em leucina; CM, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta rica em leucina; WM, ratos portadores do tumor de Walker submetidos à dieta rica em leucina e tratados com metformina. Resultados expressos como média e erro padrão da média das porcentagens dos grupos em relação ao grupo C. Número de animais igual a 3 por grupo. Tratamento com metformina: 36 mg x Kg<sup>-1</sup>.Dieta com excesso de 3% de leucina.

A expressão da proteína 20S não se apresentou alterada nos diferentes grupos experimentais (Figura 36A). Já a expressão de 19S, embora não tenha sido estatisticamente significativo, mostrou-se ligeiramente aumentada nos grupos WM e LWM (Figura 36B). A expressão da proteína 11S foi diminuída em cerca de 50% no grupo LW quando comparada ao grupo L (Figura 36C) e tendeu a elevação no grupo W.



**Figura 36**: (A) expressão da proteína 20S, (B) expressão da proteína 19S e (C) expressão da proteína 11S nos diferentes grupos experimentais. Legenda: C, ratos submetidos à dieta normoprotéica; W, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta normoprotéica tratados com metformina; LM, ratos submetidos à dieta rica em leucina; CM, ratos submetidos à dieta normoprotéica tratados com metformina; LM, ratos submetidos à dieta rica em leucina tratados com metformina; LW, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta rica em leucina; WM, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta rica em leucina; WM, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta normoprotéica e tratados com metformina; LWM, ratos portadores do tumor de Walker submetidos à dieta rica em leucina e tratados com metformina. Resultados expressos como média e erro padrão da média das porcentagens dos grupos em relação ao grupo C. Número de animais igual a 4 por grupo.\* p<0,05 em relação a L. Tratamento com metformina: 36 mg x Kg<sup>-1</sup>.Dieta com excesso de 3% de leucina.

A expressão da proteína E<sub>2</sub> foi diminuída em todos os grupos experimentais quando comparados ao grupo C, porém essas diferenças não foram estatisticamente significativas (Figura 37).

Os grupos portadores de tumor (W, LW, WM e LWM) apresentaram redução de

20% na expressão de  $E_2$  (Figura 37).

Dentre os grupos não portadores de tumor, o grupo L apresentou redução de 35%, o grupo CM de 50% e o grupo LM de 60%, quando comparados ao grupo C (Figura 37).



**Figura 37**: Expressão da proteína E<sub>2</sub> nos diferentes grupos experimentais. Legenda: C, ratos submetidos à dieta normoprotéica; W, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta normoprotéica; L, ratos submetidos à dieta rica em leucina; CM, ratos submetidos à dieta normoprotéica tratados com metformina; LM, ratos submetidos à dieta rica em leucina tratados com metformina; LW, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta rica em leucina; WM, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta normoprotéica e tratados com metformina; LWM, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta normoprotéica e tratados com metformina; LWM, ratos portadores do tumor de Walker submetidos à dieta rica em leucina e tratados com metformina. Resultados expressos como média e erro padrão da média das porcentagens dos grupos em relação ao grupo C. Número de animais igual a 3 por grupo. Tratamento com metformina: 36 mg x Kg<sup>-1</sup>.Dieta com excesso de 3% de leucina.

## 5. DISCUSSÃO

O crescimento tumoral promove grande perda de massa corpórea magra, atrofia muscular, anemia e alterações no metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas (ARGILÉS *et al.*, 2003) em função da intensa demanda por nutrientes. No presente estudo verificamos que em resposta aos efeitos do crescimento tumoral houve grande diminuição das reservas corpóreas, que incluem massa corpórea magra e gordura, como mostrado pelos dados referentes ao peso da carcaça (Figura 6), gordura perirrenal (Figura 11), gordura inguinal (Figura 12), em todos os grupos portadores de tumor (W, LW, WM e LWM). Esse fato também pode estar associado aos parâmetros séricos, sendo a proteína total sérica (Figura 16) a primeira desses parâmetros relacionada ao estado caquético associada à desnutrição, como também pelo decréscimo das concentrações séricas de albumina (Figura 17) e globulinas (Figura 18). Os menores valores encontrados nos animais portadores de tumor demonstram a intensa espoliação protéica sofrida em função da rápida evolução da neoplasia.

A presença do tumor de Walker estimula a resposta inflamatória no início do desenvolvimento da massa tumoral, porém, em estágios mais avançados, há diminuição da resposta inflamatória do hospedeiro (ZYNGIER *et al.*, 1991). Esse aumento inicial da resposta inflamatória pode ser a causa do maior peso relativo do baço encontrado nos animais portadores de tumor (Figura 9). Em resultados prévios em nosso laboratório, os animais portadores de tumor apresentam elevada secreção de corticosteróides e catecolaminas. Esse aumento poderia estar associado à resposta inflamatória promovida pela presença do tumor, que estimula a produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6, que, por sua vez, estimulam o eixo

hipotálamo-hipófise-adrenal a secretar CRH, ACTH e corticosterona (REBECA *et al*, 2008; ARGILÉS et al., 2005). Em função disso, fizemos ensaios para analisarmos a concentração de ACTH, e como observado nos animais dos grupos portadores de tumor, houve maior concentração de ACTH em relação aos grupos controles (Figura 21). O aumento da concentração de corticosterona, que aumenta a disponibilidade de glicose circulante através do estímulo à gliconeogênese e da glicogenólise, pode estar relacionado à grande taxa metabólica das células neoplásicas, e consequente utilização e captação da glicose sérica para provimento de energia para crescimento tumoral.

O aumento na secreção de corticosterona também pode explicar a diminuição das concentrações séricas de proteínas totais, albumina e globulinas (Figuras 15 a 17) nos animais portadores de tumor, já que esse hormônio estimula o catabolismo protéico. Associada à grande espoliação protéica, a concentração sérica de glicose (Figura 14) muito diminuída nos animais dos grupos portadores de tumor pode estar relacionada à intensa taxa metabólica das células neoplásicas, e, consequentemente, intensa captação e utilização da glicose sérica para provimento de energia para crescimento tumoral.

Dados na literatura demonstram que o crescimento tumoral induz intensa degradação protéica, evidenciada pelo aumento da concentração de tirosina liberada para o meio de cultura proveniente do músculo gastrocnêmio (VENTRUCCI *et al.*, 2004). Embora não tenham apresentado diferenças estatisticamente significativas, os resultados apresentados nesse trabalho mostraram que há tendência ao aumento na degradação protéica nos animais portadores de tumor (Figura 23).

A leucina estimulou a incorporação de fenilalanina no músculo gastrocnêmio nos animais não portadores de tumor (Figura 24), mostrando o estímulo positivo para a

56

síntese protéica, enquanto que a metformina modulou a síntese protéica. O grupo CM manteve a incorporação de fenilalanina semelhante ao grupo C, bem como o grupo LM, indicando que a metformina modulou a síntese protéica estimulada pela leucina. Enquanto os outros grupos portadores de tumor apresentaram incorporação de fenilalanina semelhantes, o grupo LW apresentou aumento discreto (cerca de 3 vezes maior que o grupo W porém reduzido 75% em relação ao C) (Figura 24), mostrando o estimulo exercido pela leucina, sobre a síntese protéica nos animais desse grupo (Figura 23 e Figura 24), novamente de acordo com os dados encontrados na literatura (VENTRUCCI et al., 2004). Além disso, embora a metformina tenha modulado o estimulo da síntese protéica nos grupos sem tumor, nos grupos com tumor (WM e LWM) houve melhora do *turnover* protéico muscular, sendo cerca de 8,7 e 6,3 vezes maior, respectivamente. Esses resultados sugerem que tanto a leucina quanto o tratamento com metformina promoveram estimulo para síntese protéica, garantindo melhor adaptação desse organismo portador de tumor aos efeitos deletérios do crescimento neoplásico.

A diminuição na concentração de GH e IGF-1 (Figuras 19 e 20, respectivamente) nos animais dos grupos portadores de tumor, bem como aumento na concentração de tirosina liberada no meio de incubação (Figura 23), são indicativos de que o tecido tumoral induziu diminuição do processo de síntese protéica, além de aumentar o processo de degradação, principalmente no grupo W. Embora as alterações na expressão das proteínas pertencentes ao sistema ubiquitina-proteossomo (subunidades 20S, 19S e 11S) não tenham sido muito pronunciadas nos animais portadores de tumor (Figura 36A, B e C, respectivamente), vários estudos apontam que essa via é alterada pela presença de tumor (WATERMAN *et al.*, 1999; MAXWELL *et al.*, 1999).

Há muitos estudos que comprovam o efeito anabólico do IGF-1 e também aumento da captação de aminoácidos promovidos por esse fator de crescimento. Em função do exposto, a concentração sérica de IGF-1 foi analisada para verificar se essa é uma via de sinalização importante para os processos de síntese e degradação, em ratos, como modelo experimental de câncer. Como observado, todos os grupos portadores de tumor apresentaram concentração de IGF-1 diminuída, sempre associada à menor concentração de GH, com exceção do grupo LWM, quando comparados aos grupos não portadores de tumor. Dos grupos não portadores de tumor, aqueles que foram tratados com metformina (CM e LM) embora tenham apresentado diminuição estatisticamente significativa na concentração sérica de IGF-1, associado à concentração de GH mantida ou elevada, não houve prejuízo na síntese protéica ou aumento do processo de degradação, mostrando balanço protéico semelhante ao controle. Porém, a metformina associada à suplementação de leucina promoveu melhora do balanço protéico no grupo LWM, mesmo concomitante ao decréscimo de hormônios anabólicos como GH e IGF-1. Esse fato decorre, possivelmente, da não necessidade de estimulação ou ação do IGF-1, visto que a ativação da AMPK (quinase responsável por efeitos anti-proliferativos) promovida provavelmente pela metformina direcionou para inibição da proliferação celular, principalmente neoplásica, estimulada pela insulina e IGF-1 (VIGNERI et al., 2009; MCCARTY, 2004).

A ligação do IGF-1 ao seu receptor na membrana celular leva à autofosforilação de resíduos de tirosina na porção intracelular do receptor e, posteriormente, à fosforilação do substrato do receptor de insulina (IRS-1). Nesse estudo, avaliamos duas vias de sinalização subseqüentes à ativação de IRS-1: a fosforilação e ativação de PI3K e, posteriormente, à fosforilação e ativação de Akt (PKB) e também a fosforilação e

ativação de Erk (MAPK). Assim, a redução da concentração de IRS-1 total associado à semelhante concentração de IGF-1, sugere que, nos grupos portadores de tumor tratados com metformina (WM e LWM), a melhora do balanço protéico no músculo gastrocnêmio dos animais desses grupos, correspondem às vias de sinalização para síntese protéica que podem estar reguladas por outros mecanismos. Esse fato não ocorreu nos grupos não portadores de tumor, já que o grupo CM, mesmo apresentando menor concentração de IGF-1, apresentou balanço protéico semelhante ao grupo C. Embora o grupo W tenha apresentado concentração de IRS-1 fosforilada menor que o grupo C, essa diferença foi discreta e não foi estatisticamente significativa. Entretanto, a avaliação da relação entre a concentração de IRS-1 fosforilada e IRS-1 total, que pode ser utilizada como indicativo da ativação ou não dessa proteína, apresentou alteração em todos os grupos portadores de tumor, com exceção do grupo LWM.

A sinalização celular também envolve as proteínas Stat-3 quanto Stat-6, que são proteínas transdutoras de sinal e ativadoras da transcrição, sendo estimuladas por citocinas e fatores de crescimento (SANTOS *et al.*, 2011). Embora as concentrações de IL-1, IL-6 e TNF-α não tenham sido analisadas nesse trabalho, existem trabalhos que demonstram que essas citocinas apresentam-se elevadas nos animais portadores do tumor de Walker (REBECA *et al.*, 2008; ARGILÉS *et al.*, 2005), portanto é possível aventar a hipótese que o aumento nas concentrações dessas citocinas tenha induzido ao aumento da relação entre Stat-3 fosforilada e total, em todos os grupos com tumor, e elevação da Stat-6 fosforilada, principalmente nos grupos W e LW, sugerindo provável adaptação do músculo gastrocnêmio aos efeitos deletérios do tumor. STEPHANOU (2004) propôs, em sua revisão, que o miocárdio quando em situação de injuria poderia tanto ativar a quinase Stat-1 como também a Stat-3; em seus estudos, a ativação da via

envolvendo a fosforilação da Stat-3 aumentou a sobrevida de células do miocárdio expostas a injuria por isquemia e reperfusão, reduzindo o nível de morte celular por apoptose. É provável que um dos mecanismos de adaptação a situação de efeitos deletérios induzidos pelo crescimento tumoral estejam voltadas para a preservação da musculatura, apesar a espoliação de proteína desse tecido.

Muitas evidências apontam que Jnk pode atuar como uma quinase de proteínas pró-apoptóticas (DAVIS, 2000) e, dessa forma, inibir o crescimento de células neoplásicas em alguns tipos de tumores (BOST *et al.*, 1999; POTAPOVA *et al.*, 2002). Entretanto, ressaltamos que no tecido muscular, o qual foi objeto de estudo para esse trabalho, as alterações nas concentrações de Jnk total, Jnk fosforilada e relação entre Jnk fosforilada e total (Figura 28A, B e C) não apresentaram diferenças significativas entre os grupos. Assim, novamente sugere-se que por mecanismos ainda não bem elucidados, houve adaptação tecidual em resposta aos efeitos deletérios do tumor.

Erk (também conhecida como MAPK) é uma quinase de proteínas com função central na mediação entre a ligação de múltiplos fatores de crescimento aos seus receptores na membrana celular e a transdução desses sinais. A cascata de sinalização de MEK (também conhecida como MAPKK) e Erk está relacionada a transformações e progressão de tumores, sendo que a ativação constitutiva de MEK é conhecida por causar transformação celular (SHAUL e SEGER, 2006; HOSHINO *et al.*, 1999). A via de sinalização da ErK (MAPK) é anormalmente estimulada em vários tipos de tumores, já que é responsável por fosforilar a quinase da cadeia leve da miosina, calpaína, quinase de adesão focal e paxilina (HUANG *et al.*, 2004) e essas proteínas promovem a migração das células neoplásicas (KIM e CHOI, 2010). Por outro lado, a via de sinalização da Erk também regula a atividade e a expressão proteínas da família Bcl-2,

levando à sobrevivência de células neoplásicas (BALMANNO e COOK, 2009). Fatores de crescimento, tais como IGF-1 e EGF (fator de crescimento epidérmico, do inglês: epidermal growth factor), estimulam a atividade de tirosina-quinase do receptor RTK-Grb2-SOS, que fosforilam e ativam Ras, que, por sua vez, fosforilam e ativam Raf. As proteínas Raf (A-Raf, B-Raf ou C-Raf) são responsáveis por fosforilar e ativar MEK, e essa quinase fosforila diretamente Erk1 ou Erk2 (Erk1/2) (DHILLON et al, 2007; MALUMBRES e BARBACID, 2003). No caso do músculo gastrocnêmio, aqui estudado, a concentração de Erk total foi ligeiramente menor em todos os grupos portadores de tumor, porém nos grupos W e LWM essa diminuição foi significativa. A concentração de Erk fosforilada e a relação entre Erk fosforilada e total foi muito semelhante entre esses grupos. Nesse caso, a via de sinalização da Erk não está voltada para o processo de proliferação celular, mas sim para o processo de ativação da mTOR, que no presente trabalho aventa-se a hipótese de que esta ativação não tenha ocorrido, principalmente, na musculatura dos animais portadores de tumor, corroborando o fato de que durante a presença do câncer há diminuição ou inibição do processo de síntese protéica.

Por outro lado, a Akt é uma quinase diretamente relacionada à atividade celular em muitos aspectos, como, por exemplo, captação de glicose. A leucina é um dos aminoácidos que além de atuar como sinalizador celular, também estimula a fosforilação da Akt, paralelamente à insulina, no estimulo para captação de glicose. Embora os grupos sem tumor não tenham apresentado variação na fosforilação da Akt (pelo contrário, houve redução da relação entre Akt fosforilada e total) (Figura 31C), independente da suplementação nutricional e tratamento com metformina, esse processo não implica na menor atividade celular e sim em aumento da síntese protéica e, consequentemente, melhora de todos os parâmetros corporais. Por outro lado, não seria esperada a maior atividade da Akt nos grupos portadores de tumor, porém esse resultado pode estar relacionado a outros mecanismos energéticos ou de atividade celular nesses músculos (HOMMOLBERG *et al.*, 2010).

Embora a concentração de insulina não tenha sido avaliada, tem sido demonstrado que a presença de tumor induz decréscimo da insulina circulante e muitas vezes resistência periférica à insulina. A relação diminuída entre Akt fosforilada e Akt total no grupo WM é plausível com os dados da literatura, que demonstram que a metformina atua aumentando a sensibilidade das células à insulina (VIGNERI *et al.*, 2009). Paralelamente, a ativação da AMPK pela metformina foi demonstrada em ratos, tanto em fígado quanto em músculo esquelético, e em músculo esquelético de pacientes diabéticos que recebiam doses clínicas desse fármaco (MUSI *et al.*, 2002).

A metformina age sobre a AMPK, aumentando a atividade dessa enzima, que, por sua vez, leva a inibição da via de sinalização promovida pela insulina, IGF-1 e outros fatores de crescimento, culminando com diminuição da fosforilação de Akt (Figura 31B), como observada principalmente no grupo com tumor WM.

A concentração de metformina (36 mg x Kg<sup>-1</sup>) administrada aos animais mostrouse eficaz em aumentar a concentração de glicogênio hepático (provavelmente por estimular a captação de glicose pelos hepatócitos) e também mostrou-se eficaz em diminuir o peso relativo da gordura perirrenal e gordura inguinal nos animais do grupo CM. Porém, essa concentração de metformina pode não ter sido suficiente para inibir a mTOR e, consequentemente, inibir o processo de síntese protéica no tecido tumoral (Figura 13). Embora o processo de síntese e degradação protéica no tecido tumoral não tenha sido o objetivo desse estudo, existem trabalhos que mostram que a metformina em maiores concentrações (250 a 500 mg x Kg<sup>-1</sup>) pode diminuir a viabilidade de células em cultura e o desenvolvimento da massa tumoral em modelos animais (ZOU *et al.*, 2004; ROCHA *et al.*, 2011). Entretanto, há estudos que demonstram que a metformina administrada à pacientes humanos em concentração igual a concentração máxima administrada à pacientes humanos (74  $\mu$ g x g<sup>-1</sup>) aumenta o depósito de glicogênio no miocárdio, mimetizando um quadro de cardiopatia hipertrófica e pode causar anormalidade eletrofisiológica (COSTA, 2005; ARAD *et al.*, 2001).

A mTOR é uma enzima chave para o metabolismo celular, para qual várias vias de sinalização convergem. A mTOR, em resposta à aminoácidos (especialmente leucina) e fatores de crescimento, atua fosforilando, principalmente, p70S6K e 4E-BP1. A proteína p70S6K, quando fosforilada, fosforila a proteína S6 ribossomal, enquanto que a proteína 4E-BP1, quando fosforilada, é inibida e não é mais capaz de se ligar a elF4E e, dessa forma, elF4E pode se ligar a elF4G. Embora a concentração de p70S6K total tenha sido ligeiramente aumentada nos grupos portadores de tumor e a concentração de p70S6K fosforilada tenha sido aumentada apenas nos grupo W, a relação entre p70S6K fosforilada e p70S6K total (Figura 32C) mostrou tendência de diminuição nos grupos portadores de tumor tratados com leucina e/ou metformina. Associando-se esse fato às variações de expressão do fator de iniciação eIF4G e 4E-BP1, verifica-se que havendo aumento da expressão de 4E-BP1 é possível que o processo de síntese esteja igual ou inibido. Entretanto, vale ressaltar que, no grupo LWM .os valores similares de eIF4G e 4E-BP1 (Figuras 34 e 35, respectivamente), ao do grupo controle, também estão associados ao melhor balanco protéico encontrado entre todos os grupos com tumor (Figura 25), sugerindo que a associação entre suplementação nutricional com leucina e metformina promoveu melhor adaptação da musculatura esquelética nesses animais, mesmo sob influência dos efeitos deletérios do crescimento tumoral.

## 6. CONCLUSÕES

A suplementação com leucina foi capaz de estimular a síntese protéica nos animais não portadores de tumor, e os resultados sugerem que esse efeito foi via Akt ou Erk, enquanto que a metformina estimulou a sinalização via IRS-1, levando à ativação de Erk.

A evolução do tumor de Walker promoveu efeitos deletérios, como espoliação da massa protéica muscular, através da elevação do ACTH e diminuição de GH e IGF-1, e modulação dos processos de síntese protéica, através da inibição da Erk e IRS-1.

O tratamento com metformina não foi eficaz em diminuir o crescimento das células tumorais, provavelmente em função da baixa concentração que foi administrada aos animais.
# REFERÊNCIAS

Alimova IN, Liu B, Fan Z, Edgerton SM, Dillon T, Lind SE, Thor AD (2009). "Metformin inhibits breast cancer cell growth, colony formation and induces cell cycle arrest in vitro". Cell Cycle 8 909–915.

Arad M, Benson DW, Perez-Atayde AR, McKenna WJ, Sparks EA, Kanter RJ, McGarry K, Seidman JG, Seidman CE. (2002). "Constitutively active AMP kinase mutations cause glycogen storage disease mimicking hypertrophic cardiomyopathy." J Clin Invest. Feb;109(3):357-62.

Argilés JM, Busquets S, García-Martínez C, López-Soriano FJ. (2005). "Mediators involved in the cancer anorexia-cachexia syndrome: past, present, and future." Nutrition 21;(9):977-985.

Argilés JM, Moore-Carrasco R, Fuster G, Busquets S, Lopez-Soriano FJ. (2003) "Cancer cachexia: the molecular mechanisms". Int J Biochem Cell Biol Apr;35(4):405-9.

Avruch J, Belham C, Weng Q, Hara K, Yonezawa K. (2001). "The p70 S6 kinase integrates nutrient and growth signals to control translational capacity". Prog Mol Subcell Biol 26:115–154.

Balmanno K, Cook SJ. (2009). "Tumour cell survival signalling by the ERK1/2 pathway". Cell Death Differ 16: 368–377.

Bost F, McKay R, Bost M, Potapova O, Dean NM, Mercola D. (1999). "The Jun kinase 2 isoform is preferentially required for epidermal growth factor-induced transformation of human A549 lung carcinoma cells". Mol Cell Biol 19:1938–49.

Bradford MM. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding". Anal Biochem 72, 248-254.

Cantrell LA, Zhou C, Mendivil A, Malloy KM, Gehrig PA, Bae-Jump VL. (2009). "Metformin is a potent inhibitor of endometrial cancer cell proliferation--implications for a novel treatment strategy." Gynecol Oncol 116(1): 92-8.

Choudry, HA., M. Pan, Karinch AM, Souba WW. (2006). "Branched-chain amino acidenriched nutritional support in surgical and cancer patients." J Nutr 136(1): 314S-318S.

Costa, ECS. (2005). "Glicogênio cardíaco em diabetes experimental – Efeitos do tratamento com metformina e/ou glibenclamida sobre as funções cardíacas em coração isolado". Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Brasil.

Davis RJ. (2000). "Signal transduction by the JNK group of MAP kinases". Cell 103: 239–52.

DeMartino GN, Slaughter CA. (1999). "The Proteasome, a Novel Protease Regulated by Multiple Mechanisms." J Bio Chem 274(32): 22123-22126.

Dhillon AS, Hagan S, Rath O, Kolch W. (2007). "MAP kinase signalling pathways in cancer". Oncogene 26: 3279–3290.

Doumas BT, Watson WA, Biggs HG. (1971). "Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromcresol green". Clin Chim Acta Jan;31(1):87-96.

Farout L, Lamare M, Clavel S, Briand M, Briand Y. (2003). "Differential expression of ubiquitin and proteasome-dependent pathway components in rat tissues." Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol 134(2): 297-305.

Fedele MJ, Thomas CV & Farrell PA. (2001). "Selected contribution: IGF-I antibody prevents increases in protein synthesis in epitrochlearis muscles from reefed, diabetic rats". J Appl Physiol 90 1166-73.

Feng Z, Zhang H, Levine AJ, Jin S. (2005). "The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells". P Natl Acad Sci USA 102, 8204 –8209.

Fingar DC, Richardson CJ, Tee AR, Cheatham L, Tsou C, Blenis J. (2004). "mTOR controls cell cycle progression through its cell growth effectors S6K1 and 4EBP1/eIF4E". Mol Cell Biol 24, 200–216.

Gad SC, Weil CS (1994). "Statistics for toxicologists" In: A.W. Hayes, Editor, *Principles and Methods of Toxicology* (third ed.), Raven Press, New York, pp. 221–274.

Galuska D, Nolte LA, Zierath JR, Wallberg-Henriksson H. (1994). "Effect of metformin on insulin-stimulated glucose transport in isolated skeletal muscle obtained from patients with NIDDM." Diabetologia 37(8): 826-32.

Garlick PJ. (2005). "The role of leucine in the regulation of protein metabolism." J Nutr 135(6 Suppl): 1553S-6S.

Gingras AC, Raught B, Sonenberg N. (1999) "eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation". Annu Rev Biochem. 68:913–63.

Ghosh S, May MJ, Kopp EB. (1998). "NF-κB AND REL PROTEINS: Evolutionarily Conserved Mediators of Immune Responses." Annu Rev Immunol 16(1): 225-260.

Gomes-Marcondes MC. (1994) "Influencia da gestação sobre o crescimento do câncer e deste sobre o desenvolvimento feto-placentário". Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Gomes-Marcondes MC, Honma HN, Areas MA, Cury L. (1998). "Effect of Walker 256 tumor growth on intestinal absorption of leucine, methionine and glucose in newly weaned and mature rats". Braz J Med Biol Res Oct;31(10):1345-8.

Gomes-Marcondes MC, Ventrucci G, Toledo MT, Cury L, Cooper JC. (2003). "A leucinesupplemented diet improved protein content of skeletal muscle in young tumor-bearing rats." Braz J Med Biol Res 36(11): 1589-94.

Hadad SM, Fleming S, Thompson AM. (2008) "Targeting AMPK: a new therapeutic opportunity in breast cancer". Crit Rev Oncol Hematol Jul;67(1):1-7.

Harris TE, Lawrence JC Jr. (2003). "TOR signalling". Sci STKE Dec 9;2003(212):re15.

Hassid WZ, Abrahams S. (1957). "Chemical procedures for analysis of polysaccharides". Methods Enzimol 3:34-51.

Hay N, Sonenberg N. (2004). "Upstream and downstream of mTOR". Genes Dev Aug 15;18(16):1926–45.

Hommelberg PP, Langen RC, Schols AM, Mensink RP, Plat J. (2010). "Inflammatory signaling in skeletal muscle insulin resistance: green signal for nutritional intervention?". Curr Opin Clin Nutr Metab Care Nov;13(6):647-55. Review.

Hoshino R, Chatani Y, Yamori T, Tsuruo T, Oka H, Yoshida O, Shimada Y, Ari-i S, Wada H, Fujimoto J, Kohno M. (1999). "Constitutive activation of the 41-/43-kDa mitogen-activated protein kinase signaling pathway in human tumors". Oncogene18:813–822.

Huang C, Jacobson K, Schaller MD. (2004). "MAP kinases and cell migration". J Cell Sci 117: 4619–4628.

Hundal HS, Ramlal T, Reyes R, Leiter LA, Klip A. (1992). "Cellular mechanism of metformin action involves glucose transporter translocation from an intracellular pool to the plasma membrane in L6 muscle cells." Endocrinology 131(3): 1165-73.

Inoki K, Zhu T, Guan KL. (2003). "TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival." Cell 115(5): 577-90.

Inoki K, Corradetti MN, Guan KL. (2005). Dysregulation of the TSC-mTOR pathway in human disease. Nat Genet Jan;37(1):19-24.

Kim EK, Choi EJ. (2010). "Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases". BBA-MOL BASIS DIS 1802: 396–405.

Khal J, Hine AV, Fearon KCH, Dejong CHC, Tisdale MJ. (2005). "Increased expression of proteasome subunits in skeletal muscle of cancer patients with weight loss". Int J Biochem Cell Biol 37: 2196–2206

Koepp DM, Harper JW, Elledge SJ. (1999). "How the Cyclin Became a Cyclin: Regulated Proteolysis in the Cell Cycle." Cell 97(4): 431-434.

Kourelis T V, Siegel RD. (2011). "Metformin and cancer: new applications for an old drug". Med Oncol DOI 10.1007/s12032-011-9846-7.

Krikos A, Laherty CD, Dixit VM. (1992). "Transcriptional activation of the tumor necrosis factor  $\alpha$ -inducible zinc finger protein, A20, is mediated by  $\kappa$ B elements." J. Biol. Chem. 267, 17971–17976.

Laemmli UK. (1970), "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature 227, 680-685.

Li J, Rechsteiner M. (2001). "Molecular dissection of the 11S REG (PA28) proteasome activators." Biochimie 83(3-4): 373-83.

Lorite MJ, Thompson MG, Drake JL, Carling G, Tisdale MJ. (1998). "Mechanism of muscle protein degradation induced by a cancer cachectic factor". Br J Cancer Oct;78(7):850-6.

Lynch CJ, Hutson SM, Patson BJ, Vaval A, Vary TC. (2002). "Tissue-specific effects of chronic dietary leucine and norleucine supplementation on protein synthesis in rats." Am J Physiol Endocrinol Metab 283(4): E824-35.

McCarty, MF. (2004). "Chronic activation of AMP-activated kinase as a strategy for slowing aging." Med Hypotheses 63 334–339.

Malumbres M, Barbacid M. (2003). "RAS oncogenes: the first 30 years". Nat. Rev. Cancer 3:459–465.

Manning BD, Tee AR, Logsdon MN, Blenis J, Cantley LC. (2002). "Identification of the tuberous sclerosis complex-2 tumor suppressor gene product tuberin as a target of the phosphoinositide 3-kinase/akt pathway." Mol Cell 10(1): 151-62.

Mathews MB, Sonenberg N, Hershey JWB. Origins and Principles of Translational Control. In: Mathews MB, Sonenberg N, Hershey JWB, editor. "Translational Control in Biology and Medicine". (2007). Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press. p. 1–40.

Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, Wykoff CC, Pugh CW, Maher ER, Ratcliffe PJ. (1999). "The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis." Nature May 20;399(6733):271-5.

Meyuhas O. (2000). "Synthesis of the translational apparatus is regulated at the translational level". Eur J Biochem Nov;267(21):6321–30.

Musi N, Hirshman MF, Nygren J, Svanfeldt M, Bavenholm P, Rooyackers O, Zhou G, Williamson JM, Ljunqvist O, Efendic S, Moller DE, Thorell A, Goodyear LJ. (2002). "Metformin increases AMP-activated protein kinase activity in skeletal muscle of subjects with type 2 diabetes". Diabetes 51:2074–81.

Pause A, Belsham GJ, Gingras AC, Donzé O, Lin TA, Lawrence JC Jr, Sonenberg N. (1994). "Insulin-dependent stimulation of protein synthesis by phosphorylation of a regulator of 5'-cap function." Nature Oct 27;371(6500):762–7.

Pickart, CM. (2001). "Mechanisms underlying ubiquitination." Annu Rev Biochem 70(1): 503-533.

Potapova O, Anisimov SV, Gorospe M, Dougherty RH, Gaarde WA, Boheler KR, Holbrook NJ. (2002) "Targets of c-Jun NH(2)-terminal kinase 2-mediated tumor growth regulation revealed by serial analysis of gene expression". Cancer Res 62:3257–63.

71

Rebeca R, Bracht L, Noleto GR, Martinez GR, Cadena SM, Carnieri EG, Rocha ME, de Oliveira MB. (2008). "Production of cachexia mediators by Walker 256 cells from ascitic tumors." Cell Biochem Funct. Aug;26(6):731-8.

Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr. (1993). "AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet." J Nutr 123(11): 1939-1951.

Rocha GZ, Dias MM, Ropelle ER, Osório-Costa F, Rossato FA, Vercesi AE, Saad MJ, Carvalheira JB. (2011). "Metformin Amplifies Chemotherapy-Induced AMPK Activation and Antitumoral Growth." Clin Cancer Res. Jun 15;17(12):3993-4005.

Rock KL, Goldberg AL. (1999). "Degradation of cell proteins and the generation of mhc class i-presented peptides." Annu Rev Immunol 17(1): 739-779.

Ruderman NB, Cacicedo JM, Itani S, Yagihashi N, Saha AK, Ye JM, Chen K, Zou M, Carling D, Boden G, Cohen RA, Keaney J, Kraegen EW, Ido Y. (2003). "Malonyl-CoA and AMP-activated protein kinase (AMPK): possible links between insulin resistance in muscle and early endothelial cell damage in diabetes." Biochem Soc Trans 31(Pt 1): 202-6.

Santos CI, Costa-Pereira AP. (2011). "Signal transducers and activators of transcription—from cytokine signalling to cancer biology." Biochim Biophys Acta. Apr 5;1816(1):38-49.

Shaul YD, Seger R. (2007). "The MEK/ERK cascade: From signaling specificity to diverse functions". Biochim Biophys Acta. Aug;1773(8):1213-26.

Stephanou A. (2004). "Role of STAT-1 and STAT-3 in ischaemia/reperfusion injury." J Cell Mol Med Oct-Dec;8(4):519-25. Review

Stith BJ, Woronoff K, Wiernsperger N. (1998). "Stimulation of the intracellular portion of the human insulin receptor by the antidiabetic drug metformina". Biochem Pharmacol 55(4): 533-6

Suryawan A, Davis TA. (2010). "The abundance and activation of mTORC1 regulators in skeletal muscle of neonatal pigs are modulated by insulin, amino acids, and age". J Appl Physiol Nov;109(5):1448-54.

Tisdale, M. (1997). "Biology of cachexia." J. Natl. Cancer Inst. 89(23): 1763-1773.

Trinder P. (1969). "Determination of Glucose in Blood Using Glucose Oxidase with an Alternative Oxygen Acceptor", Ann Clin Biochem 6, 24-25.

van Slegtenhorst M, Nellist M, Nagelkerken B, Cheadle J, Snell R, van den Ouweland A, Reuser A, Sampson J, Halley D, van der Sluijs P.(1998) "Interaction between hamartin and tuberin, the TSC1 and TSC2 gene products" Hum Mol Genet 7(6): 1053-7.

Vary TC, Dardevet D, Grizard J, Voisin L, Buffiere C, Denis P, Breuille D & Obled C. (1998). "Differential regulation of skeletal muscle protein synthesis turnover by insulin and IGF-I after bacteremia". Am J Physiol-Endocrinol Metab 275 E584-E593.

Ventrucci G, Mello MA, Gomes-Marcondes MC. (2001) "Effect of a leucine supplemented diet on body composition changes in pregnant rats bearing Walker 256". Braz J Med Biol Res Mar;34(3):333-8.

Ventrucci G, MA Mello, MCC Gomes-Marcondes. (2004). "Proteasome activity is altered in skeletal muscle tissue of tumour-bearing rats a leucine-rich diet." Endocr Relat Cancer 11(4): 887-95.

Ventrucci G, MA Mello, MCC Gomes-Marcondes. (2007). "Leucine-rich diet alters the eukaryotic translation initiation factors expression in skeletal muscle of tumour-bearing rats." BMC Cancer 7: 42.

Verma R, Deshaies RJ. (2000). "A Proteasome Howdunit: The Case of the Missing Signal." Cell 101(4): 341-344.

Vigneri P, Frasca F, Sciacca L, Pandini G, Vigneri R. (2009). "Diabetes and cancer". Endocr-Relat Cancer 16 1103–1123.

Voges D, Zwickl P, Baumeister W. (1999). "The 26s proteasome: A Molecular Machine Designed for Controlled Proteolysis." Annu Rev Biochem 68(1): 1015-1068.

Vucic D, Dixit VM, Wertz IE. (2011). "Ubiquitylation in apoptosis: a post-translational modification at the edge of life and death" Nature Reviews Molecular Cell Biology 12, 439-452.

Waalkes TP, Udenfriend S. (1957). "A fluorometric method for the estimation of tyrosine in plasma and tissues". J Lab Clin Med Nov;50(5):733-6.

Wang X, Proud CG. (2009). "Nutrient control of TORC1, a cell-cycle regulator." Trends Cell Biol. Jun;19(6):260-7.

Waterman H, Alroy I, Strano S, Seger R, Yarden Y. (1999). "The C-terminus of the kinase-defective neuregulin receptor ErbB-3 confers mitogenic superiority and dictates endocytic routing." EMBO J Jun 15;18(12):3348-58.

Wullschleger S, Loewith R, Hall MN. (2006). "TOR signaling in growth and metabolism." Cell 124(3): 471-84.

Zyngier S, Scarpinella Bueno MA, Krybus J, Novak A, Feder D, Cabral M, Nassis CZ, Andrade Jr AF, Pena SC. (1991). "Alteration on inflammatory and immunological response in animals bearing experimatal tumor." Arq Med ABC 14(1): 24-17.

Zou MH, Kirkpatrick SS, Davis BJ, Nelson JS, Wiles WG 4th, Schlattner U, Neumann D, Brownlee M, Freeman MB, Goldman MH. (2004). "Activation of the AMP-activated Protein Kinase by the Anti-diabetic Drug Metformin in Vivo: Role of mitochondrial reactive nitrogen species." J Biol Chem. Oct 15;279(42):43940-51.

Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, Wu M, Ventre J, Doebber T, Fujii N, Musi N, Hirshman MF, Goodyear LJ, Moller DE. (2001). "Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action." J Clin Invest 108(8): 1167-74.

## 7. ANEXOS

## 7.1. Tabelas suplementares

Tabela 1: Resumo das variações observadas nos parâmetros somáticos dos diferentes grupos experimentais em relação ao grupo C. Legenda: C, ratos submetidos à dieta normoprotéica; W, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta normoprotéica; L, ratos submetidos à dieta rica em leucina; CM, ratos submetidos à dieta normoprotéica tratados com metformina; LM, ratos submetidos à dieta rica em leucina tratados com metformina; LW, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta rica em leucina; WM, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta rica em leucina; LWM, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta rica em leucina; LWM, ratos portadores do tumor de Walker submetidos à dieta normoprotéica e tratados com metformina; LWM, ratos portadores do tumor de Walker submetidos à dieta normoprotéica e tratados com metformina; LWM, ratos portadores do tumor de Walker submetidos à dieta normoprotéica e tratados com metformina; LWM, ratos portadores do tumor de Walker submetidos à dieta rica em leucina e tratados com metformina ≈ não apresenta variação em relação ao grupo C; ↓ diminuição em relação ao grupo C; ↑ aumento com relação ao grupo C. NA: não aplicável.

		_	_	_	_	Peso	Peso		_
	Peso	Peso	Peso	Peso	Peso	relativo	relativo	Peso relativo	Peso
	F 650	relativo	relativo	relativo	relativo	Telativo	Telativo	músculo	relativo
	carcaça			_		gordura	gordura		
	(a)	Coração	figado	Baço	Adrenal	perirrenal	inquinal	Gastrocnêmio	tumor
	(9)	(%)	(%)	(%)	(%)	pennena	inguinai	(%)	(%)
			. ,	. ,	. ,	(%)	(%)		
C	165 5	0.48	52	0 54	0.017	1	1	0.6	NA
Ŭ	100.0	0.40	0.2	0.04	0.017			0.0	
W	Ļ	~	Ť	1	1	Ļ	Ļ	Ļ	11.5
L	~	~	~	~	~	~	~	~	NA
СМ	~	~	~	~	~	~	~	~	NA
LM	~	~	~	~	~	~	~	~	NA
LW	Ļ	~	Ť	↑	Ť	Ļ	Ļ	Ļ	~
WM	Ļ	~	Ť	1	1	Ļ	Ļ	Ļ	~
LWM	Ļ	~	Ť	1	1	Ļ	Ļ	Ļ	~

**Tabela 2:** Resumo das variações observadas nos parâmetros séricos e teciduais nos diferentes grupos experimentais em relação ao grupo C. Legenda: C, ratos submetidos à dieta normoprotéica; W, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta normoprotéica; L, ratos submetidos à dieta rica em leucina; CM, ratos submetidos à dieta normoprotéica tratados com metformina; LM, ratos submetidos à dieta rica em leucina; WM, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta rica em leucina; WM, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta rica em leucina; WM, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta rica em leucina; LWM, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta rica em leucina; LWM, ratos portadores do tumor de Walker submetidos à dieta rica em leucina e tratados com metformina. ≈ não apresenta variação em relação ao grupo C; ↓ diminuição em relação ao grupo C; ↑ aumento com relação ao grupo C.

	Glicose (mg/dL)	Proteínas totais (g/dL)	Albumina (g/dL)	Globulinas (g/dL)	GH (pmol/mL)	IGF-1 (pmol/mL)	ACTH (pmol/mL)	Proteína Gastrocnêmio (µg/µL)	Tirosina (URF/mg/h)	Fenilalanina (CPM/h/µg)	Balanço Protéico (%)
С	90.0	6.7	3.0	3.7	670.0	314.5	3.3	5.9	29350	0.05	100
W	↓	Ļ	Ļ	Ļ	Ļ	Ļ	¢	Ļ	1	*	Ļ
L	*	*	*	*	<b>↑</b>	*	~	*	↑	Ť	↑
СМ	~	*	*	*	*	Ļ	~	↑	Ť	~	*
LM	~	~	~	~	¢	Ļ	~	↑	↑	~	~
LW	Ļ	Ļ	Ļ	Ļ	Ļ	Ļ	¢	~	↑	~	Ļ
WM	Ļ	$\downarrow$	Ļ	$\downarrow$	$\downarrow$	$\downarrow$	¢	~	↑	~	*
LWM	Ļ	Ļ	$\downarrow$	↓	¢	Ļ	*	Ļ	↑	*	*

**Tabela 3:** Resumo das variações observadas na expressão de proteínas da via ubiquitina-proteossomo e fatores de iniciação nos diferentes grupos experimentais em relação ao grupo C. Legenda: C, ratos submetidos à dieta normoprotéica; W, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta normoprotéica; L, ratos submetidos à dieta rica em leucina; CM, ratos submetidos à dieta normoprotéica tratados com metformina; LM, ratos submetidos à dieta rica em leucina; WM, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta normoprotéica e tratados com metformina; LW, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta normoprotéica e tratados com metformina; LW, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta normoprotéica e tratados com metformina; LWM, ratos portadores do tumor de Walker submetidos à dieta normoprotéica e tratados com metformina; LWM, ratos portadores do tumor de Walker submetidos à dieta rica em leucina e tratados com metformina; LM, ratos portadores do tumor de Walker submetidos à dieta normoprotéica e tratados com metformina; LMM, ratos portadores do tumor de Walker submetidos à dieta rica em leucina e tratados com metformina; LMM, ratos portadores do tumor de Walker submetidos à dieta rica em leucina e tratados com metformina. ≈ não apresenta variação em relação ao grupo C. Unidade Relativa de Fluorescência/μg de proteína.

	IRS- 1	P- IRS- 1	P- IRS- 1/ IRS- 1 total	Stat- 3	P- Stat- 3	P- Stat- 3/ Stat- 3 total	P- Stat- 6	Jnk	P- Jnk	P- Jnk/ Jnk total	Erk	P- Erk	P- Erk/ Erk total	Akt	P- Akt	P- Akt/ Akt total	P70S6K	P- p70S6K	P- p70S6K/ P70S6K total
С	4.7	1.3	0.3	0.2	0.22	1.32	0.1	3.3	5.6	1.8	8.3	24.0	3.0	0.4	2.1	8.2	5.6	0.95	0.19
W	$\downarrow$	*	↑	*	*	*	*	*	*	*	$\downarrow$	*	*	*	*	*	*	*	*
L	*	ĸ	*	*	*	ĸ	ĸ	*	*	ĸ	*	ĸ	*	ĸ	*	*	*	*	*
CM	$\downarrow$	ĸ	*	*	*	ĸ	ĸ	*	*	ĸ	*	ĸ	*	ĸ	*	*	*	*	*
LM	$\downarrow$	ĸ	*	*	*	ĸ	ĸ	*	*	ĸ	*	$\downarrow$	$\downarrow$	ĸ	*	*	*	*	*
LW	$\downarrow$	*	1	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
WM	$\downarrow$	*	↑	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	$\downarrow$	*	*	*
LWM	$\downarrow$	$\downarrow$	*	*	ĸ	ĸ	и	*	×	ж	$\downarrow$	↓	ĸ	и	×	*	*	*	*

Tabela 4: Resumo das variações observadas na expressão de proteínas da via ubiquitina-proteossomo e fatores de iniciação nos diferentes grupos experimentais em relação ao grupo C. Legenda: C, ratos submetidos à dieta normoprotéica; W, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta normoprotéica; L, ratos submetidos à dieta rica em leucina; CM, ratos submetidos à dieta normoprotéica tratados com metformina; LM, ratos submetidos à dieta rica em leucina; WM, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta normoprotéica è tratados com metformina; LW, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta rica em leucina; WM, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta normoprotéica e tratados com metformina; LWM, ratos portadores de tumor de Walker submetidos à dieta normoprotéica e tratados com metformina; LWM, ratos portadores do tumor de Walker submetidos à dieta normoprotéica e tratados com metformina; LM, ratos portadores do tumor de Walker submetidos à dieta normoprotéica e tratados com metformina; LM, ratos portadores do tumor de Walker submetidos à dieta normoprotéica e tratados com metformina; LM, ratos portadores do tumor de Walker submetidos à dieta rica em leucina e tratados com metformina. ≈ não apresenta variação em relação ao grupo C.

	GAPDH (%)	elF4G (%)	4E-BP1 (%)	20S (%)	19S (%)	11S (%)	E <sub>2</sub> (%)
С	100	100	100	100	100	100	100
W	~	~	~	~	~	~	~
L	~	~	~	~	~	~	~
СМ	~	~	~	~	~	~	~
LM	*	*	*	*	*	*	~
LW	*	*	*	~	*	*	~
WM	~	~	~	~	~	~	~
LWM	~	~	~	~	~	~	~

## 7.2. Certificado e declaração da Comissão de ética



o tratamento com metformina e suplementação nutricional com leucina no metabolismo protéico de ratos portadores de tumor de Walker 256", sob a responsabilidade de <u>Profa. Dra. Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes /</u> <u>Andre Gustavo de Oliveira</u>, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em <u>09 de fevereiro de 2009</u>.

#### CERTIFICATE

We certify that the protocol nº <u>1763-1</u>, entitled "<u>Effects of metformin treatment</u> <u>associated to leucine rich-diet on protein metabolism in tumor-bearing rats</u>", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on <u>February 9, 2009</u>.

Campinas, 09 de fevereiro de 2009.

Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo Presidente

Fátima Alonso Secretária Executiva

CEEA – Unicamp Caixa Postal 6109 13083-970 Campinas, SP – Brasil Telefone: (19) 3521-6359 E-mail: comisib@unicamp.br http://www.ib.unicamp.br/ceea/

#### DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação de mestrado/tese de doutorado intitulada "Avaliação da associação entre o tratamento com metformina e suplementação nutricional com leucina no metabolismo protéico de ratos portadores do tumor de Walker 256"

( ) não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

Tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões):

 ( ) CIBio – Comissão Interna de Biossegurança, projeto No.2008/05, Instituição: Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.

(X) CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais, projeto No. 1763-1, Instituição:

Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP.

) CEP - Comissão de Ética em Pesquisa, protocolo No. \_\_\_\_\_, Instituição:

\* Caso a Comissão seja externa ao IB/UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.

Alino: André Gustavo de Oliveira

Orientador: Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

Carimbo e assinatura

Profa. Dra. ANA MARIA APARECIDA GUARALDO Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente: () Deferido () Indeferido

Juida quardab arimbo e assinatura/