LUCAS MACERATESI ENJIU

Efeito da administração de metformina e β-alanina na prevenção da inflamação hipotalâmica associada ao câncer

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2016

LUCAS MACERATESI ENJIU

Efeito da administração de metformina e β-alanina na prevenção da inflamação hipotalâmica associada ao câncer

Tese apresentada ao Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientador: Prof. Dr. José César Rosa Neto

Versão original

São Paulo
2016

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Maceratesi Enjiu, Lucas
Efeito da administração de metformina e beta-alanina na prevenção da inflamação hipotalâmica associada ao câncer / Lucas Maceratesi Enjiu; orientador José César Rosa Neto. -- São Paulo, 2016.
82 p.

Tese (Doutorado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Neoplasias. 2. Inflamação. 3. Biologia celular. 4. Expressão gênica. 5. Anorexia. I. Rosa Neto, José César, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Lucas Maceratesi Enjiu

Título da Tese: Efeito da administração de metformina e β-alanina na prevenção da inflamação hipotalâmica associada ao câncer

Orientador(a): Prof. Dr. José Cesar Rosa Neto

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

Examinador(a): Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

Examinador(a): Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

Examinador(a): Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

Presidente: Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

ICBUSP

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP · Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética no Uso de Animais - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que a solicitação de licença de uso de animais intitulada "***Efeito da suplementação de beta-alanina na prevenção da inflamação hipotalâmica associada à caquexia***", registrada sob **nº 67**, nas fls. 33, do livro 3, foi analisada e aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-ICB/USP) em 03/08/2015.

Por esta licença, estão autorizados a manipular animais dentro dos limites do projeto proposto e no âmbito da Lei Federal nº 11.794, o Dr.(Dra.) ***José Cesar Rosa Neto*** (Investigador Principal) e os membros da equipe: *Lucas Maceratesi Enjiu*. Esta licença de uso de animais expira em 03/08/2019.

Havendo interesse na renovação da proposta, a solicitação deverá ser protocolada pela secretaria da CEUA-ICB/USP *até o último dia de validade da atual proposta*. Após essa data, uma nova proposta deverá ser encaminhada.

CERTIFICATE

We hereby certify that permission for the use of animals was granted to the research proposal "***Beta-alanine supplementation effect in preventing the cachexia associated with hypothalamic inflammation***", registered as **Number 67**, in pages 33, of book 3, by the local ETHICS COMMITTEE ON THE USE OF ANIMALS (CEUA-ICB/USP) in 8/3/2015.

Under this license, ***José Cesar Rosa Neto*** (Principal Investigator) and team members *Lucas Maceratesi Enjiu* are authorized to make use of animals within the limits of the research proposal presented to this committee and of the Brazilian Federal Law nº 11.794.

This license expires in 8/03/2019. In case the investigators wish to renew this license, this must be presented to CEUA-ICB/USP before the last day of validity of the present license. After such date, a new research proposal must be presented.

São Paulo, 13 de agosto de 2015.

Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes
Coordenador CEUA-ICB/USP

Eliane Aparecida G. M. Nascimento
Secretária CEUA-ICB/USP

Dedico esta obra a minha família, a minha esposa e ao meu filho pelo apoio ao longo da vida e ao ideal de mudarmos o País através da educação

Agradecimentos

Agradeço a todos os colegas de laboratório, Edson Lima, Alexandre Abílio, Camila Oliveira, Luana Biondo, Helena Batatinha, Loreana Silveira, Tiego Diniz, Luiz Carnevali, que me ajudaram de alguma forma para a conclusão desta tese. A Adriane, pelo excelente suporte técnico. Ao pessoal do biotério, no auxílio do tratamento e cuidados dos animais. Aos profissionais da biblioteca que estiveram sempre à disposição para ajudar no que fosse necessário. Agradeço em especial meu orientador Professor Dr. José César Rosa Neto, pelos seus ensinamentos e paciência para meu amadurecimento não só apenas na área cientifica, mas também para minha vida pessoal e profissional.

A minha família e amigos, em especial meus pais Otavio Toshiaki Enjiu e Sonia Regina Maceratesi Enjiu, aos meus irmãos Daniel Maceratesi Enjiu e Caio Maceratesi Enjiu (*in memoriam*), a minha esposa Aline Becca Avelino Enjiu e ao meu filho Kenzo Becca Avelino Maceratesi Enjiu (razões da minha vida) que sempre me apoiaram, me aconselharam e depositaram toda confiança para que este sonho pudesse ser realizado.

RESUMO

Enjiu LM. Efeito da administração de metformina e β-alanina na prevenção da inflamação hipotalâmica associada ao câncer. [Tese (Doutorado em Biologia Celular e Tecidual)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

O câncer é um problema de saúde pública mundial, principalmente em países em desenvolvimento. Essa doença pode ocasionar anorexia, que afeta cerca de metade de todos os pacientes estando presente em grande proporção nos indivíduos com câncer avançado. Sabe-se que mediadores inflamatórios desempenham importante papel no desenvolvimento da anorexia relacionada ao câncer. Sabidamente, a ingestão alimentar é regulada pelo hipotálamo por meio da secreção de neurotransmissores orexígenos e anorexígenos, que podem ser modulados pelo processo inflamatório desencadeado pelo tumor, ocasionando anorexia no indivíduo afetado. Estudos realizados com carnosina (β-alanina-L-histidina) e metformina demonstraram eficiente ação antiinflamatória e antitumoral. Tal ação antiinflamatória poderia otimizar os mecanismos de controle hipotalâmico na secreção dos referidos neurotransmissores. O objetivo deste estudo foi analisar a ação da metformina e da β-alanina no controle do crescimento tumoral e da produção das citocinas pró e antiinflamatórias, na secreção dos neuropeptídios no hipotálamo. Foram utilizados 25 camundongos machos, divididos em grupo controle (C), grupo controle portador de tumor (CT), grupo portador de tumor suplementado com β-alanina (TB), grupo portador de tumor administrado com metformina (TM) e grupo portador de tumor administrado com metformina e β-alanina (TMB). Os grupos CT e TM apresentaram maior concentração de lactato em relação aos demais grupos. Tanto no hipotálamo quanto no tumor o grupo CT apresentou maior expressão das citocinas inflamatórias em relação aos demais grupos. Concluímos que os tratamentos utilizados demonstraram um potencial efeito benéfico frente ao tumor, demonstrando uma interessante estratégia coadjuvante para o tratamento do câncer.

Palavras-chave: Câncer. β-alanina. Metformina. Inflamação. Anorexia.

ABSTRACT

Enjiu LM. Effect of administration of metformin and β-alanine in the prevention of hypothalamic inflammation associated with cancer. [Ph. D. Thesis (Tissue and Celular Biology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

Cancer is a worldwide public health problem, especially in developing countries. This disease can lead to anorexia, which affects about half of all patients and is present in the majority of advanced cancer patients. It is known that inflammatory mediators play an important role in the development of cancer-related anorexia. It is well known that food intake is regulated by the hypothalamus through the secretion of neurotransmitters and exogenous anorectic agents, which can be modulated by the inflammatory process triggered by the tumor, causing anorexia in the affected individual. Studies with carnosine (β-alanine-L-histidine) and metformin demonstrated an effective anti-inflammatory and anti-tumor action. Such an anti-inflammatory action could optimize the mechanisms of hypothalamic control in the secretion of these neurotransmitters. The aim of this study was to analyze the action of metformin and β-alanine in the control of tumor growth and the production of pro and anti-inflammatory cytokines in the secretion of neuropeptides in the hypothalamus. A total of 25 male mice, divided into control group (C), tumor-bearing control group (CT), tumor-bearing group supplemented with β-alanine (TB), tumor-bearing group administered metformin (TM) Tumor administered with metformin and β-alanine (TMB). The TM group showed a significant weight loss and a lower food intake in relation to groups C and TMB. The CT and TM groups showed higher lactate concentration in relation to the other groups. All treatments induced lower expression of the inflammatory cytokines in relation to CT, in hypothalamus and tumor. We conclude that the treatments used showed a potential beneficial effect against the tumor, demonstrating an interesting supporting strategy for the treatment of cancer.

Keywords: Cancer. β-alanine. Metformin. Inflammation. Anorexia.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - A influência do ambiente na incidência de câncer.....16

Figura 2 – Ativação dos oncogenes.....18

Figura 3 – Microambiente tumoral.....20

Figura 4 – *Hallmarks of cancer*.....22

Figura 5 - Possíveis alternativas para ação terapêutica que interfere na capacidade tumoral.....25

Figura 6 – Alvo primário da ação da metformina.....32

Figura 7 – Mecanismos de ação da metformina.....33

Figura 8 – Controle da proliferação e crescimento tumoral pela metformina.....36

Figura 9 – Metabolismo da carnosina.....42

Figura 10 – Resultados obtidos no mestrado, peso corporal, consumo de água e ração e peso tumoral.....44

Figura 11 - Resultados obtidos no mestrado, análise da expressão gênica.....45

Figura 12 - Resultados obtidos no mestrado, análise da expressão proteica.....45

Figura 13 – Desenho experimental do trabalho.....49

Figura 14 – Peso corporal dos animais ao longo do tempo.....52

Figura 15 – Consumo de ração dos animais ao longo do tempo.....53

Figura 16 – Análise dos tecidos corporais.....53

Figura 17 – Análise do peso tumoral.....54

Figura 18 – Análise do lactato.....55

Figura 19 – Análise da expressão gênica de leptina e neuropeptídios reguladores do apetite no hipotálamo.....56

Figura 20 - Análise da expressão gênica e proteica de IL-1β no hipotálamo.....56

Figura 21 – Análise da expressão gênica e proteica de IL-6 no hipotálamo.....57

Figura 22 – Análise da expressão gênica e proteica de TNF-α no hipotálamo.....57

Figura 23 – Análise da expressão gênica e proteica de IL-10 no hipotálamo.....58

Figura 24 – Análise da expressão gênica e proteica de IL-1β no tumor.....59

Figura 25 – Análise da expressão gênica e proteica de IL-6 no tumor.....59

Figura 26 – Análise da expressão gênica e proteica de TNF-α no tumor.....60

Figura 27 – Análise da expressão gênica e proteica de IL-10 no tumor.....60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLA

OMS	Organização Mundial de Saúde
EROs	Espécies reativas de oxigênio
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
IL-1β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IFN	Interferons
NPY	Neuropeptídio Y
POMC	Pró-ópiomelanocortina
AgRP	Proteína agouti-relacionada
CART	Peptídeo regulador de transcrição de cocaína e anfetamina
α-MSH	Hormônio estimulante de melanocortina
MC4R	Receptor de melanocortina 4
GLUT-4	Transportador de glicose 4
OCT-1	Transportador de cátion orgânico 1
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina 1
FAS	Ácido graxo sintase
NF-κB	Fator nuclear kappa B
G-6-P	Glicose 6 fosfato
GLP-1	Peptídeo semelhante ao glucagon 1
LDH	Lactato desidrogenase

CN 1	Carnosinase plasmática 1
CN 2	Carnosinase plasmática 2

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 15

2 CÂNCER 18

2.1 Inflamação hipotalâmica **27**

3 METFORMINA 31

4 β-ALANINA 40

5 JUSTIFICATIVA 47

6 OBJETIVO 48

6.1 Objetivos Específicos **48**

6.1.1 Analisar o efeito anti-anorexígeno da β-alanina ocasionado pelos efeitos da metformina e do tumor **48**

6.1.2 Determinar e quantificar as citocinas pró e anti-inflamatórias (IL-1β, IL-6, IL-10 e TNF-α) no hipotálamo **48**

6.1.3 Examinar o efeito da suplementação sobre a secreção de leptina, fator fundamental na modulação da expressão de neuropeptídios anorexígenos e orexígenos **48**

6.1.4 Mensurar a produção e contribuição de citocinas pelo tumor **48**

7 CASUÍSTICAS E MÉTODOS 49

7.1 Animais **49**

7.2 Grupos experimentais **49**

7.3 Tratamento **50**

7.4 Implante tumoral **50**

7.5 Reação em cadeia da polimerase – transcrição reversa (RT-PCR) **50**

7.5.1 *Extração de RNA total* **50**

7.5.2 Obtenção do cDNA e amplificação dos genes de interesse por PCR **50**

7.7 Medida da concentração por método ELISA **50**

7.8 Análise estatística **51**

8 RESULTADOS 52

8.1 Tratamento dos animais **52**

8.2 Avaliação da expressão gênica e proteica no hipotálamo **55**

8.3 Avaliação da expressão gênica e proteica no tumor **58**

9 DISCUSSÃO 61

10 CONCLUSÃO 65

REFERÊNCIAS 66

1 INTRODUÇÃO

O câncer é um problema de saúde pública mundial, principalmente em países em desenvolvimento. Essa doença vem se tornando cada vez mais comum no mundo todo. Sabe-se que o câncer é uma das doenças crônicas degenerativas que mais levam a morte no mundo inteiro, sendo a segunda causa de morte no mundo, perdendo apenas para as doenças cardiovasculares (1–3).

O termo câncer é um termo genérico para um grande grupo de doenças que podem acometer qualquer parte do corpo. O câncer pode ser definido como uma rápida reprodução celular anormal que cresce além de seus limites normais, com a capacidade de invasão e metástase (4,5).

É estimado para as décadas futuras que o câncer estará presente em mais de 20 milhões de pessoas em 2025. A estimativa para 2012 apontou 14 milhões de novos casos, sendo que cerca de 60% desses novos casos ocorreram em países em desenvolvimento. No Brasil, a estimativa para o biênio 2016-2017 é de 600 mil novos casos (1,2,6).

Dentre os homens, os cinco tipos mais comuns de câncer são: pulmão, próstata, colorretal, estomago e fígado. Já dentre as mulheres, os tipos mais comuns são: mama, colorretal, pulmão, colo do útero e estômago (1,2).

O aparecimento e desenvolvimento dessa morbidade tem como causa fatores genéticos que levam os indivíduos a predisposição, assim como fatores ambientais, tabagismo, dieta, obesidade, infecções, sedentarismo e consumo excessivo de álcool (1,2).

É relatado que o câncer pode ser prevenido evitando-se a exposição aos seus fatores de riscos. Estudos sugerem que o câncer é uma doença causada principalmente pelo ambiente em que a pessoa vive do que sua própria biologia. A figura 01 ilustra a influência do ambiente na incidência de câncer (1,2).

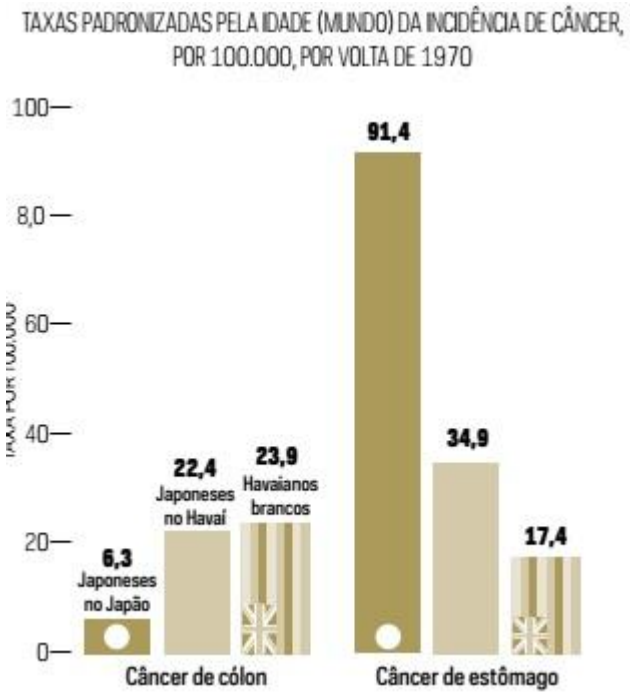

Figura 1 - As taxas nos japoneses que vivem no Havaí são mais semelhantes às taxas nos havaianos brancos que as dos japoneses que vivem no Japão.

Essa doença, daqui a alguns anos, passará a ser a primeira causa de morte devido a uma piora nos hábitos da população mundial. Dentre esses hábitos podemos citar o tabagismo, é estimado que cerca de 1,3 bilhões de pessoas no mundo, atualmente, fumam cigarros industrializados e que todas as formas de tabacos são cancerígenas. Além disso, o tabagismo pode aumentar o risco de 16 tipos de câncer e corresponde a um quinto das mortes por câncer no mundo. O sedentarismo, hábitos alimentares e obesidade também podem aumentar o risco de câncer (7,8).

Os tratamentos atuais para o câncer englobam a cirurgia, como o padrão ouro, e a quimioterapia e radioterapia. Esses procedimentos são eficazes no combate contra o tumor e resultam na diminuição da morbidade e da mortalidade desses pacientes. As terapias convencionais são benéficas quando se trata de aumentar a sobrevida global (8,9).

A quimioterapia foi criada no início do século 20, mas não com a finalidade de um tratamento para o câncer. Os pesquisadores descobriram que as pessoas expostas ao gás de mostarda apresentavam uma diminuição no número de células brancas no sangue e começaram a estudar seu efeito no câncer (8,10).

Em 1940 foram examinados os efeitos terapêuticos da mostarda no tratamento de linfoma, injetando uma forma menos agressiva do gás mostarda em ratos portadores de tumor evidenciando que a massa tumoral desses animais foi reduzida (8,11,12).

Após essa descoberta, outros tipos de quimioterápicos começaram a ser investigados. A partir da década de 80, começou a ser utilizado o uso concomitante de quimioterápicos com diferentes mecanismos de ação, levando há uma melhora na sobrevida dos pacientes (8,12).

Não obstante, os quimioterápicos têm um potencial efeito sobre a inibição do desenvolvimento da massa tumoral, muitos são os efeitos deletérios que essas drogas causam, com piora na qualidade de vida e muitas vezes na expectativa de vida dos sujeitos tratados com a quimioterapia. Com o intuito de melhor a tolerância ao tratamento sem perder a eficácia, tem se estudado a utilização de coquetéis de drogas com uma concentração menor, que possam diminuir os efeitos colaterais sem perder a eficiência (9,10,12).

Os efeitos colaterais da quimioterapia incluem: dano e morte de células saudáveis, anemia, perda do apetite, constipação, diarréia, perda de pelos e cabelos, fadiga, desidratação, alterações no paladar, osteoporose, insônia, entre outros (13–16).

Além disso, esses tratamentos estão associados com efeitos deletérios de médio/longo prazo. No sistema cardiovascular pode ocasionar hipertensão, doença arterial coronariana e infarto do miocárdio. Estudos demonstram que pacientes que utilizaram o quimioterápico cisplatina, apresentaram um risco aumentado em duas vezes para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares em comparação com a população saudável (13–15).

É de extrema relevância o estudo de outros tratamentos que sejam eficazes e que apresentem menores efeitos colaterais quando comparados aos tratamentos convencionais. Dentre esses tratamentos podemos citar a metformina e as intervenções nutricionais, como a suplementação de aminoácidos, dentre estes a β-alanina (17,18).

2 CÂNCER

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) o câncer é o crescimento e a proliferação descontrolada de células que sofreram mutações ao longo do tempo ou por algum defeito no seu código genético, podendo afetar qualquer parte do corpo. Essas células podem invadir o tecido circunvizinho e alcançar locais distantes (metástase).

O câncer é uma doença genética que envolve mudanças dinâmicas no DNA celular, levando há uma expressão gênica anormal nessas células. Tal fato resulta em um aumento na expressão dos genes envolvidos no crescimento, sobrevivência e a proliferação celular (6,19,20).

Na literatura são descritos dois tipos de genes que influenciam o surgimento do câncer. Os oncogenes e os genes supressores de tumores. Os oncogenes controlam o crescimento, a sobrevivência e a proliferação celular. Em células não mutadas, a expressão dos oncogenes estão muito bem reguladas. Já em células tumorais há uma super expressão dos oncogenes, resultando em uma proliferação e divisão celular incontrolada e um aumento na sobrevivência dessas células. Os oncogenes podem ser ativados de três maneiras, como demonstrado na figura abaixo (20,21).

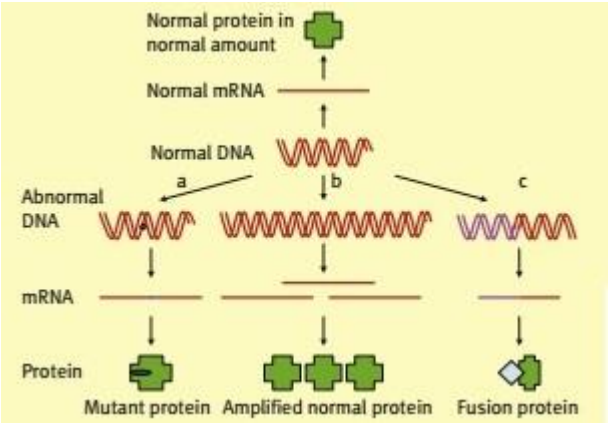

Figura 2 (adaptado de Harrington, 2011) - A expressão do gene não mutada leva a formação de RNAm não mutado e a produção de proteínas em níveis normais. a) mutações específicas no DNA ocasionam em alterações na sequência de aminoácidos, ocasionando em atividade aumentada; b) o aumento no número de RNAm resulta na formação aumentada de proteínas; c) a translocação de parte do DNA pode resultar na geração de uma proteína com a atividade biológica aumentada.

Já os genes supressores de tumor são responsáveis pela inibição da proliferação e sobrevivência celular. Esses genes estão envolvidos no controle da progressão do ciclo celular e da morte celular programada (apoptose) (20,21).

Estudos demonstram que a tumorigênese é um processo que ocorre em várias etapas, e a cada etapa, reflete em alterações genéticas que conduzem as células normais a se transformarem em células malignas (5,22,23).

Nas últimas décadas, o tumor já não é mais visto como um acúmulo de células mutantes com uma homogeneidade relativa, mas sim como um órgão que se desenvolveu e apresenta complexidade superior aos tecidos não mutados (24,25).

O microambiente tumoral define o comportamento das células tumorais. Trata-se de uma rede dinâmica que não inclui apenas as células tumorais, mas inclui outras células como as células do sistema imune, fibroblastos, tecido vascular e etc, ilustrado na figura abaixo (25,26):

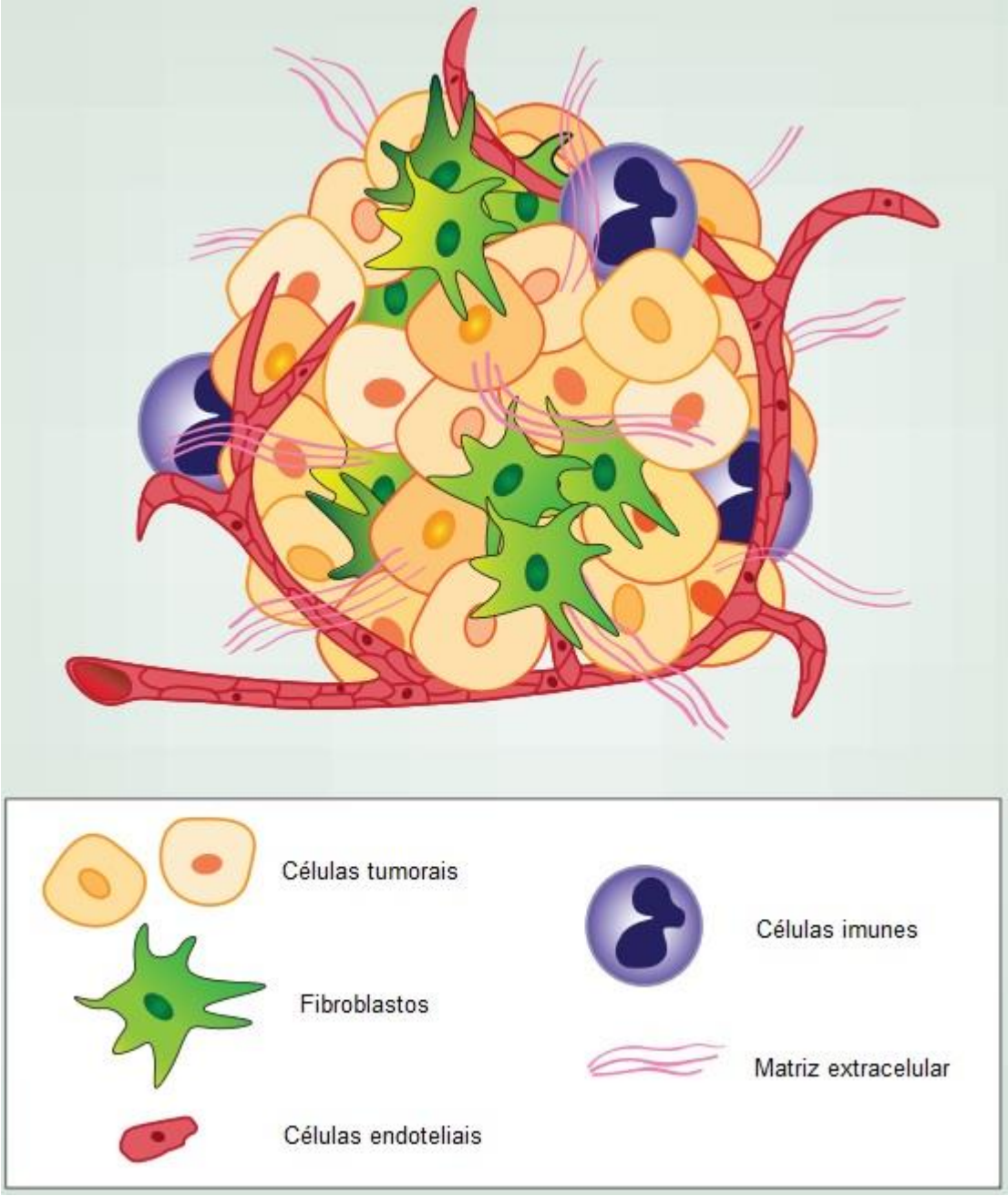

Figura 3 (adaptado de Marks et al., 2016) - Representação esquemática das células tumorais e não tumorais no microambiente tumoral. A figura demonstra como os tumores são compostos: por células tumorais, fibroblastos, células do sistema imune (linfócitos, células dendríticas, macrófagos e etc), células endoteliais e por fibras da matriz extracelular.

Estudos demonstram que o microambiente tumoral é deficiente em oxigênio e caracterizado por um pH baixo. Ainda, o microambiente tumoral é responsável pela indução de mutações nas células que estão ao seu redor. De fato, uma das propriedades deste microambiente é a tensão de oxigênio, caracterizado por hipóxia intermitente. Essa sucessão de períodos induz a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), que por sua vez, induzem danos ao DNA (25,27).

Os fibroblastos tornam-se ativos em tumores devido aos fatores produzidos no microambiente tumoral, como as EROs. A ativação dos fibroblastos por esses fatores faz com que eles se tornem cada vez mais proliferativos e aumentem a secreção de proteínas da matriz extracelular e outros fatores de crescimento, além de alterar o citoesqueleto (24,25,27).

O microambiente tumoral também pode influenciar na quimioterapia, ocasionando uma quimiorresistência. Os fatores de crescimento e as citocinas são partes importantes no microambiente tumoral em resposta à quimioterapia. Os fibroblastos associados ao câncer também demonstram papel importante na quimiorresistência (28–30).

Devido a essas alterações que ocorrem no tumor e no seu microambiente, Hanahan e Weinberg (2011) descreveram dez alterações que ocorrem no câncer, os chamados *hallmarks of cancer*. Esses *hallmarks of cancer* são: instabilidade genômica e mutação, resistência à morte celular, desregulação do metabolismo energético, proliferação sustentada, autossuficiência em sinais de crescimento, evasão do sistema imune, replicação infinita, inflamação, ativação de invasão e metástase e indução da angiogênese. Cada uma destas capacidades adquiridas durante o desenvolvimento do tumor representa um mecanismo de defesa contra a resposta celular contra a progressão do câncer.

Figura 4 (adaptado de Hanahan e Weinberg, 2011) - A figura demonstra os 10 *hallmarks of cancer*.

Uma das características das células tumorais é a capacidade de sustentar a proliferação desenfreada, pois há uma desregulação nos sinais de crescimento. Essas células adquirem essa capacidade de formas distintas: podem produzir os sinais de crescimento e responder a eles e; podem enviar sinais, que estimulam as células não mutantes que estão no microambiente tumoral, a produzirem e fornecerem os fatores de crescimento para as células tumorais (18,31–34).

Além disso, as células tumorais podem aumentar seus receptores, tornando essas células mais sensíveis e responsivas aos fatores de crescimentos, mesmo quando liberados em pequena quantidade (18,31–34).

Além disso, essas células que sofreram mutações também conseguem regular os genes supressores de tumor. Tais genes integram os sinais intra e extracelular, podendo inibir a progressão do ciclo celular (18,31–34).

Outro fator importante para a progressão tumoral é sua capacidade de replicação ilimitada, também conhecida como imortalização celular. A replicação celular é controlada pelos telômeros. Quando a célula envelhece, essas estruturas diminuem seu tamanho e são induzidas a apoptose. A capacidade de replicação infinita é marcada pela capacidade que as células tumorais possuem em manter seus telômeros em tamanho ideal para a replicação celular e escapar da apoptose (18,31–34).

A replicação e progressão tumoral podem favorecer sucessivos clones com instabilidade genômica e mutações. Cada clone pode adquirir mutações que favorecem a progressão tumoral (como por exemplo, a inativação dos genes supressores de tumor) e a evadir-se da apoptose (18,31–34).

Tanto é verdade, que estudos de genética moleculares realizados por meio de análise genômica comparativa demonstraram que muitos tumores demonstravam mutações cromossômicas, revelando uma clara evidência da perda no controle da integridade genômica nessas células. Ainda, a recorrência de mutações específicas (como amplificações e/ou deleções) em locais específicos do genoma favorecem a progressão neoplásica (18,31–34).

Uma alternativa para o controle da progressão e replicação sustentada das células tumorais é a apoptose, que serve como uma defesa natural contra o câncer. Sua regulação ocorre por meio da recepção e processamento dos sinais indutores de morte celular e detecção e integração desses sinais. A ativação das caspases é responsável por esse processo de morte celular(18,31–34).

Contudo, as células tumorais possuem uma variedade de estratégias para evadir-se da apoptose, sendo a mais comum, a deleção da proteína p53. Ainda, há um aumento na expressão de genes anti-apoptóticos (Bcl-2 e Bcl-XL) ou de genes que estão envolvidos com sobrevivência celular (Bax, Bim, Puma) (18,31–34).

Somado a esses fatores, a apoptose pode acometer as células vizinhas, matando-as, e as células tumorais podem consumi-las (18,31–34).

As células tumorais, assim como as demais células, necessitam de uma grande demanda energética para a manutenção de seu metabolism ativo. Frente ao exposto,

essas células possuem a capacidade de induzir a angiogênese. Durante a progressão tumoral, os fatores angiogênicos (como o VEGF) são ativados para ajudar na sustentação energética para o tumor. O VEGF pode ser regulado de duas formas: pela hipóxia ou pela sinalização oncogênica (18,31–34).

O aumento na vascularização pode aumentar a chance de invasão dos tecidos adjacente e de metástase. A capacidade de invadir os tecidos e metástase é promovida devido a alterações na sua forma, bem como na adesão célula/célula e da célula com a matriz extracelular (18,31–34).

Em condições aeróbias ideais, as células produzem energia na forma de ATP por meio da fosforilação oxidativa mitocondrial. Contudo, o metabolismo celular tumoral é alterado, produzindo lactato mesmo em condições aeróbias. Apesar de a glicólise aeróbia ser menos eficiente na produção energética, acredita-se que as células tumorais se utilizam desse processo para suprir suas demandas (35,36).

O aumento na produção de lactato pelas células tumorais gera uma diminuição do pH no microambiente tumoral. Essa acidose tem efeitos sobre o metabolismo celular, na progressão da doença e na resposta terapêutica para os agentes quimioterápicos. Além disso, a acidose modula também a angiogênese e a inflamação (37–39).

O acúmulo de lactato e, consequentemente, o aumento da acidose pode reduzir a citotoxicidade de alguns agentes quimioterápicos. Ainda, a acidose pode alterar a absorção da droga, comprometendo ainda mais sua eficácia em combater a doença (40–42).

É postulado na literatura que a terapia com substância que agem como um tampão da acidose metabólica (como a β-alanina) pode ser eficaz no controle da doença e potencializar os efeitos dos fármacos (17,18,43,44).

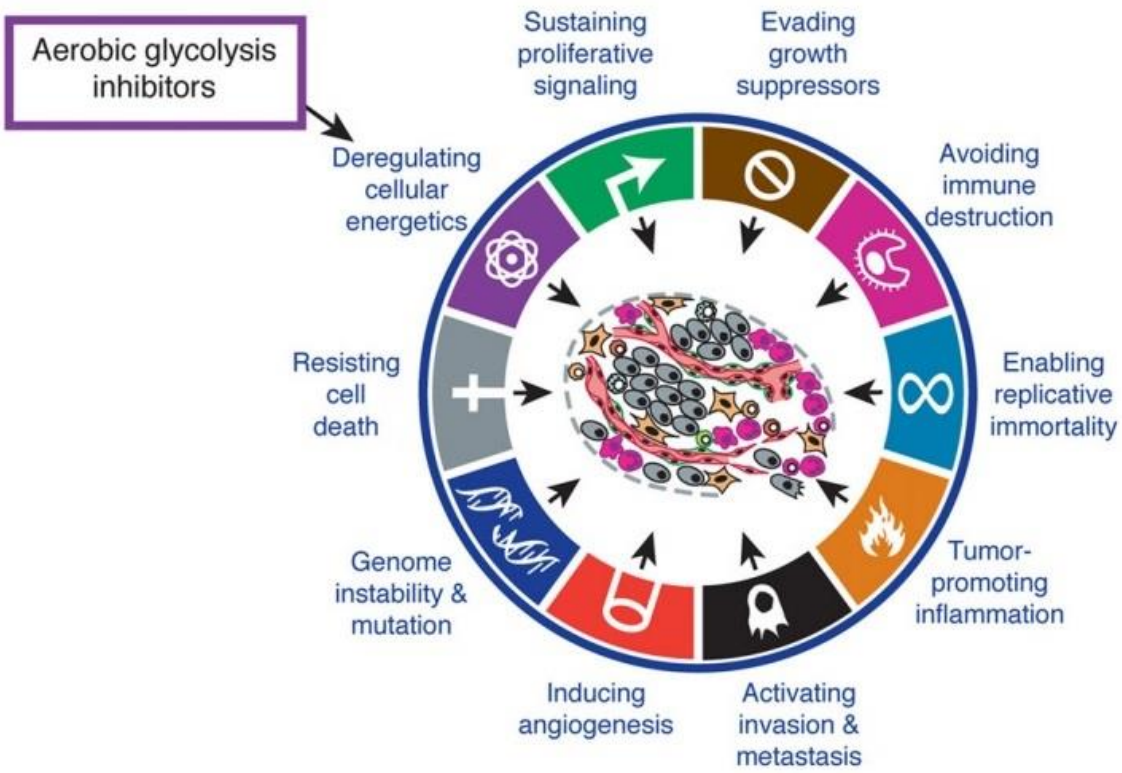

Figura 5 (adaptado de Hanahan e Weinberg, 2011) - Possíveis alternativas para ação terapêutica que interfere na capacidade tumoral. Inibidores de glicólise aeróbia ou do aumento de lactato é uma estratégia para a atenuação da progressão tumoral.

Ainda, o aumento da acidose pelo tumor induz a expressão de genes relacionados à inflamação como o fator de necrose tumoral (TNF)-α e as interleucinas (IL). O aumento da resposta inflamatória pode ser um dos principais contribuintes para o desencadeamento da anorexia associada ao tumor (40,42,45).

As citocinas são reguladores chave de defesa do organismo mediada pelo SNC, apresentam importante função no desenvolvimento dos sintomas das doenças, tanto na fase aguda quanto na fase crônica, como a caquexia (46–48).

Essas proteínas são produzidas por células inflamatórias, podendo funcionar como mediadores parácrinos. A inflamação sistêmica mediada por lesão celular ou pela ativação do sistema imunológico desencadeia uma resposta inflamatória aguda pelo excesso de liberação de citocinas (49–51).

O excesso de liberação de citocinas demonstra papel importante na imunomodulação e podem implicar na etiologia da anorexia, perda de peso, disfunção cognitiva e anemia. Sabe-se que a resposta inflamatória, quando presente constantemente, pode levar ao desenvolvimento da caquexia (52–56).

As citocinas demonstram papel relevante na anorexia induzida pelo câncer, pois elas modulam a motilidade e o esvaziamento gástrico, de forma direta (no sistema gastrointestinal) ou de forma indireta (no sistema nervoso, alterando os sinais eferentes que regulam a saciedade) (53–55,57).

De fato, estudos em modelos animais demonstraram que a administração de citocinas pró-inflamatórias (IL-1β e TNF-α) induzem anorexia, perda de peso, lipólise, proteólise e aumento na resistência periférica à insulina (55,58–60).

Evidências demonstram que a inflamação acomete as vias de sinalização, tanto central quanto periférica, bem como na progressão tumoral. Além disso, altos níveis destas citocinas inflamatórias podem ocasionar em hipermetabolismo e perda acentuada de peso (61–63).

As citocinas inflamatórias são sinais enviados a partir das células tumorais para induzir uma resposta catabólica no tecido adiposo e muscular, tais como a IL-1β, IL-6 e TNF-α. Esses mediadores químicos podem agir sistemicamente, acometendo o SNC (63–65).

Uma das estratégias para a atenuação da anorexia associada ao câncer é diminuir a resposta inflamatória ocasionada pelo tumor, induzindo o aumento no ganho de peso corporal. Nesse aspecto, estratégias nutricionais, como o uso da L-cartinitina e a carnosina, têm demonstrado resultados promissores em reduzir o perfil inflamatório, principalmente no hipotálamo, e na indução do aumento de peso corporal (17,18,44,66,67).

Por fim, sabe-se que nos tumores há a infiltração de diversas células do sistema imunológico (linfócitos, macrófagos, células NK) e que essas contribuem para as condições inflamatórias que acometem os tecidos saudáveis. Pensava-se que essa infiltração de células do sistema imunológico nos tumores seria uma tentativa do organismo no combate ao tumor. Contudo, evidências demonstram que a infiltração é uma resposta do tumor na tentativa de evasão da defesa do hospedeiro. Acredita-se então que neste contexto, os macrófagos e linfócitos infiltrados no tumor podem trabalhar em favor do aumento da proliferação das células tumorais (18,31–34).

2.1 Inflamação hipotalâmica

O hipotálamo, órgão localizado em uma pequena região do diencéfalo, desempenha importante papel na homeostasia corporal sistêmica, no controle do sistema nervoso autônomo e está diretamente envolvido na secreção dos neuropeptídios orexígenos: neuropeptídio Y (NPY) e peptídeo agouti-relacionado (AgRP) e anorexígenos: pró-ópiomelanocortina (POMC) e peptídeo regulador de transcrição de cocaína e anfetamina (CART), neurotransmissores essenciais para a regulação do comportamento alimentar e que se tornam alterados na caquexia (68,69). Sendo este órgão um alvo crítico da ação das citocinas inflamatórias, levando-o a um estado inflamatório (70,71).

Classicamente a sensação fome e saciedade são controladas por hormônios que irão induzir essas populações de neurônios na regulação da fome/saciedade (60,72).

A leptina, hormônio secretado pelo tecido adiposo, é considerada um potente sinal adipostático, que afetará o balanço energético. Este hormônio age no hipotálamo sobre duas populações de neurônios: orexígenos, que secretam NPY e AgRP e os anorexígenos, que secretam CART e α-MSH (hormônio estimulante de melanocortina), este último é derivado da POMC (73–76).

A regulação, dessas populações neuronais, depende da concentração de leptina. Quando ela está aumentada, há uma inibição dos neurônios orexígenos (NPY e AgRP) e uma estimulação dos neurônios anorexígenos (α-MSH e CART), acarretando em uma diminuição da ingestão alimentar. Quando ocorre o contrário, baixa concentração de leptina, há uma estimulação dos neurônios orexígenos e uma inibição dos neurônios anorexígenos, ocasionando aumento da ingestão alimentar (73–76).

O sistema da melanocortina desempenha papel crucial na homeostase energética. Quando há um excesso nos estoques energéticos, o neuropeptídio POMC é estimulado e libera a melonacortina pelos terminais axônicos, ativando o receptor de melanocortina MC4R, suprimindo a ingestão de alimentos e aumentando o gasto energético, bem como a ativação dos neuropeptídios orexígenos (NPY e AgRP) (60,77,78).

A perda de 10% do peso corporal leva a uma redução de 50% na leptina circulante e por outro lado, quando se há um ganho de 10% do peso corporal o nível de leptina circulante aumenta em até 300% (73–76).

A perda de peso é o principal estimulo para a ingestão de alimentos tanto em humanos quanto em animais. A perda de peso, em pessoas eutróficas, faz com que haja um decréscimo nos níveis de leptina, induzindo a um balanço energético positivo. Tal ação se deve a redução da concentração de leptina sinalizar ao hipotálamo, onde este libera os neuropeptídios orexígenos (NPY e AgRP) e inibe a liberação dos anorexígenos (CART e POMC). É postulado na literatura que o neuropeptídio AgRP é um antagonista para os receptores de melanocortina (MC4Rs) (79–81).

Tanto é verdade que infusão central de AgRP ameniza os sintomas de anorexia e promove o ganho de peso corporal. Esse resultado sugere que durante as doenças crônicas (como a caquexia) há uma diminuição da atividade dos neurônios NPY/AgRP e o aumento da atividade dos neurônios POMC/CART. Além da diminuição da atividade de NPY/AgRP, há uma diminuição na expressão dos receptores para NPY, chamados receptores Y1 (79–81).

Durante a caquexia/anorexia há perda tanto de massa magra quanto de massa gorda, fazendo com que a concentração de leptina diminua, diminuindo a estimulação de POMC/CART e estimulando NPY/AgRP induzindo assim, aumento na ingestão de alimentos e uma redução do gasto energético (73,79,82,83).

Contudo, o aumento da inflamação pelo tumor induz há uma resposta equivocada do hipotálamo, estimulando constantemente os neurônios POMC/CART. A literatura postula que a interleucina-1β desempenha um papel mimetizador da leptina, levando há uma indução constante da estimulação dos neurônios POMC/CART (73,75,79,82).

Além disso, a IL-1β também pode ser produzida pelo sistema nervoso central e somada à liberação periférica desta citocina, induz potentemente anorexia (84). Em modelos animais, foi verificado que há um aumento muito significativo na expressão de mRNA de IL-1β (58,84,85).

Como demonstrado por Lira et al., (2011) na vigência da caquexia, ratos portadores de tumor de Walker 256 apresentaram um aumento significativo (de aproximadamente 2,5 x) na expressão de mRNA de IL-1β no hipotálamo em relação

ao grupo controle. Esse aumento da IL-1β refletiu diretamente no consumo alimentar desses animais que permaneceu reduzido, mesmo com uma concentração baixa de leptina.

Estudos demonstram que o surgimento do tumor é um grande desafio para as células do sistema imunológico, onde ambos produzem e secretam diversas citocinas inflamatórias, tais como, TNF-α, IL-6 e IL-1β (59,86,87).

O hipotálamo reage aos estímulos a que é submetido e coordena uma resposta de fase aguda por meio da modulação do sistema neuroendócrino ao metabolismo periférico, que está sofrendo alguma alteração, para assegurar uma reserva energética alta para sustentar o sistema imunológico (86,88,89).

O termo resposta de fase aguda refere-se a um estado inflamatório que ocorre no indivíduo após uma lesão no tecido. Essa resposta de fase aguda evita que haja danos em órgãos, limite o crescimento de organismos invasores, remova moléculas prejudiciais ao organismo e ative processos de reparação tecidual (86,88,89).

As transmissões dos sinais imunológicos periféricos para o cérebro podem seguir duas vias: pela circulação sanguínea, as citocinas conseguem transpor a barreira hemato-encefálica via transporte ativo, alcançando assim, o cérebro ou por meio do nervo vago. A estimulação do nervo vago por patógenos ou mediadores químicos derivados de células imunes ativam os neurônios do núcleo do trato solitário, enviando informações para a área do hipotálamo responsável pela regulação da ingestão de alimentos (86,88,89).

Laviano et al., (2008) sugeriram que o microambiente inflamatório ocasionado pelo tumor libera fatores de crescimento tumoral, sendo esses fatores detectados por vias aferentes vagais. Essa informação é processada pelo hipotálamo, ocasionando em estimulação dos neurônios POMC e inibição dos neurônios NPY.

A progressão e o crescimento tumoral afetam a estabilidade do metabolismo celular tanto perifericamente quanto centralmente, podendo levar há um quadro de anorexia. As citocinas que são produzidas e liberadas podem agir de forma autócrina, parácrina ou endócrina, estabelecendo uma conexão (63,88,90).

Durante a progressão do tumor, há um desequilíbrio entre a produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias (TNF-α, IL-1β e IL-6) e antiinflamatórias (IL-10), interferindo no controle da homeostasia e da ingestão de alimentos (59,84,87).

Tal fato ocorre, pois, o sistema nervoso central apresenta muito receptores para citocinas, incluindo o hipotálamo. Tanto é verdade, que estudos demonstraram que pequenas doses de IL-1β injetado centralmente são efetivas para induzir anorexia. Ainda, o crescimento tumoral está diretamente relacionado com o aumento da liberação de IL-1β no plasma sanguíneo (53,59,91).

As citocinas pró-inflamatórias alteram a neuroquímica do cérebro aumentando a liberação de neurotransmissores que induzem a via neuronal anorexígena, como a via da serotonina. Elas ainda ativam o sistema da melanocortina, podendo induzir o catabolismo (54,77).

É sabido que durante o câncer as áreas que fazem o controle da homeostasia energética e controle alimentar estão comprometidas. Diversas evidências apontam que a expressão gênica e proteica de IL-1 no hipotálamo está aumentada, o que é correlacionado negativamente com a ingestão de alimentos (92,93).

Durante o estresse crônico, como a caquexia, a micróglia apresenta papel chave na neuroinflamação, pois elas são as células imunitárias efetoras no cérebro e estão envolvidas no início, manutenção e progressão da inflamação central (54,93).

Os mecanismos de interação entre neuroinflamação, inflamação sistêmica e a progressão tumoral ainda não são completamente entendidos. Porém, há uma estreita relação causal entre neuroinflamação e inflamação sistêmica na vigência da caquexia (54,57,93).

Todos esses fatores neuroquímicos que ocorrem no hipotálamo na vigência da síndrome da caquexia associada ao câncer levam ao desenvolvimento da neuroinflamação, mantendo o indivíduo em catabolismo intenso e em estado de anorexia, potencializando assim, a síndrome da caquexia (54,71,93).

Demonstrando assim, que o hipotálamo apresenta grande importância na mediação não apenas da anorexia, mas também na síndrome da caquexia pela influência do balanço energético e no balanço das vias anabólicas e catabólicas (54,57,71,93).

3 METFORMINA

A metformina (1,1-dimetilbiguanida) é um medicamento bastante utilizado para o tratamento da diabetes do tipo 2 (há cerca de 50 anos), é considerada a droga “padrão ouro” para o tratamento destes pacientes. Sua meia vida no plasma é de aproximadamente 2 a 6 horas, porém alguns compartimentos, como os eritrócitos e os enterócitos, aumentam essa meia vida por até 14 horas (94–96).

Essa droga é postulada como uma droga segura, apresentando poucos efeitos colaterais. Suas principais funções incluem: a inibição do complexo mitocondrial 1, diminuição da gliconeogênese hepática, melhora o transporte de glicose via aumento ad translocação de GLUT-4, para o tecido adiposo e músculo esquelético, redução da hiperglicemia e retarda a absorção de glicose pelo intestino, sem ocasionar hipoglicemia (36,95–97).

Além disso, apresenta efeitos positivos em pessoas com risco cardiovascular, promove uma melhora no perfil lipídico, modula os marcadores inflamatórios e reduz o risco de desenvolver câncer (97,98).

A metformina é considerada, um agente antihiperglicêmico, por reduzir a concentração de glicose no sangue sem culminar em hipoglicemia. Tal ação pode ser explicada por um aumento na sensibilidade à insulina promovida pela metformina e aumento nos níveis plasmáticos do peptídeo semelhante ao glucagon (GLP)-1 (99–101).

Ainda, a função primária no controle da glicemia, a metformina reduz a produção de glicose hepática inibindo a gliconeogênese. Diversos são os mecanismos para que tal fato ocorra, como a ação inibitória na atividade enzimática na gliconeogênese hepática (99–102).

Os hepatócitos expressam o transportador de cátion orgânico (OCT)-1 que facilita a entrada da metformina no fígado. Estudos demonstram que a concentração de metformina no fígado é maior comparado aos outros tecidos do corpo. Tanto é verdade, que a deleção do OCT-1 em camundongos demonstrou uma redução na captação de metformina pelo fígado e um menor efeito sobre a glicemia desses animais (99,102–104).

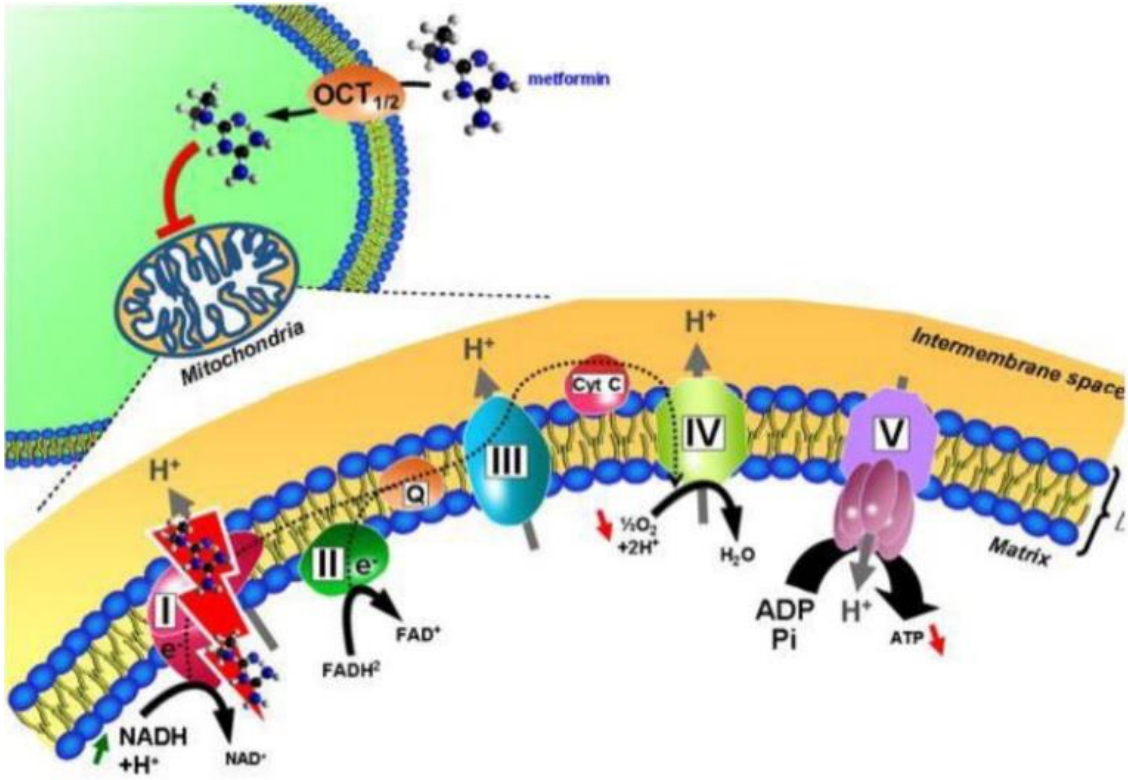

Figura 6 - A mitocôndria é o alvo primário da ação da metformina. Este fármaco inibe a cadeia respiratória mitocondrial, especificamente o complexo mitocondrial 1, afetando toda a maquinaria mitocôndria e a produção de energia pela cadeia respiratória, pois diminui a oxidação de NADH.

Quanto aos alvos moleculares da metformina, a enzima mais bem estudada no controle da ação *downstream* desta droga é a quinase sensível ao AMP (AMPK). Essa proteína funciona como um indicador dos estoques energéticos do corpo, é composta por três subunidades, uma catalítica (subunidade α) e duas regulatórias (subunidades β e γ). A AMPK é ativada quando há um aumento na razão AMP/ATP, que é resultante do desequilíbrio entre a produção e o consumo de energia (99,100,102).

A ativação da AMPK reduz as vias de consumo de ATP para restabelecer o equilíbrio energético. Dessa forma, a síntese de glicose, proteínas e lipídios, bem como o crescimento celular são inibidas, enquanto que a oxidação dos ácidos graxos e a captação de glicose são estimuladas (100,102).

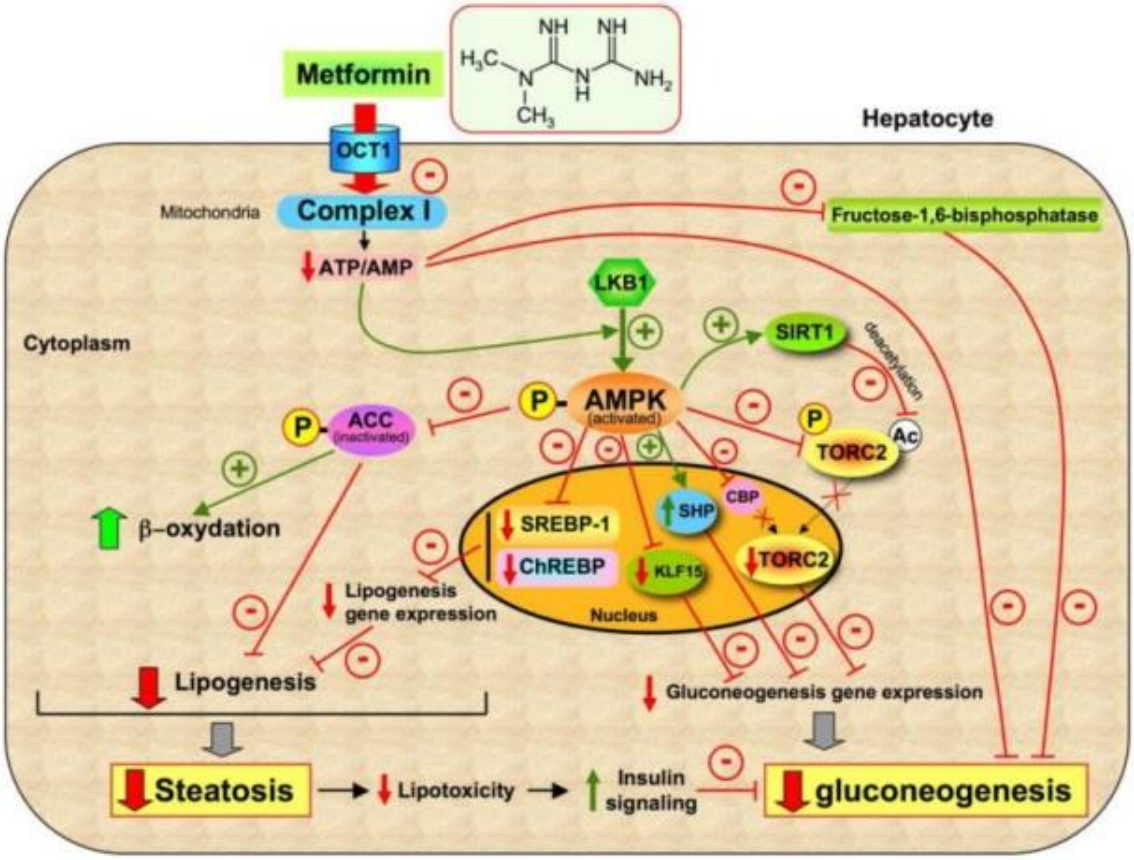

Figura 7 - Mecanismos de ação da metformina sobre a gliconeogênese hepática. Após a metformina ser absorvida pela mitocôndria via OCT1, a ativação da AMPK inibe a expressão dos genes relacionados à gliconeogênese.

Sabe-se que pessoas com diabetes apresentam maior propensão ao desenvolvimento de câncer quando comparado com pessoas com outras doenças crônicas. Esse aumento no risco para o câncer é, principalmente, atribuído ao aumento nos níveis de fatores de crescimento no plasma, como a insulina (100,102,105).

Somado a esse efeito pró oncogênico da insulina, a hiperglicemia, a exacerbação do estresse oxidativo e a inflamação podem aumentar o risco de desenvolvimento do câncer (100,102,105,106).

De fato, seu efeito anticancerígeno vem sendo estudado nas últimas décadas como uma terapia efetiva na prevenção do câncer. Tal efeito deve-se ao controle da proliferação das células tumorais. Contudo, essa droga apresenta alguns efeitos colaterais, tais como, aumento do lactato e anorexia (96,97,100,102).

Estudos realizados com pacientes diabéticos demonstraram uma redução de até 40% no risco de desenvolvimento de câncer, quando comparado com indivíduos tratados com outros fármacos hipoglicemiantes (96,98,107).

Foi visto ainda, que este fármaco atenua a progressão do tumor (106,108). Contudo, há poucas evidências comprovando os efeitos benéficos do uso metformina sobre o câncer em pacientes não diabéticos (96,98,109).

A literatura relata que o uso da metformina em pacientes não diabéticos foi capaz de reduzir seletivamente os marcadores celulares de proliferação e de crescimento em mulheres com câncer de mama, demonstrando assim, propriedades quimioterápicas (106,110,111).

A redução da proliferação celular tumoral está diretamente relacionada com a inibição do ciclo celular no estágio G_0/G_1 e não pela indução da apoptose. Sahra et al., (2008) demonstraram que a administração de metformina inibe a expressão de proteínas responsáveis pelo controle do ciclo celular (ciclina D1 e pRb), sendo essas as duas principais reguladoras do ciclo celular.

Os mecanismos pela qual a metformina consegue atenuar o crescimento tumoral ainda não estão bem definidos. Contudo, os mecanismos prováveis para o controle tumoral promovido pela metformina são a inibição do estímulo de crescimento tumoral e a supressão de escapes metabólicos que são realizados pelas células tumorais. Essas inibições podem ter associação com a insulina (insulino dependente) ou não (insulino não dependente) (36,99,100,112).

Outro efeito interessante no tratamento do câncer com a metformina é a redução da hiperglicemia, diminuindo assim, o aporte energético para o tumor e reduzindo o efeito de Warburg e, consequentemente, a produção de lactato pelo tumor (36,106,112,113).

Ainda, a ativação da via da AMPK pela metformina também pode inibir a glicólise aeróbia utilizada por algumas células tumorais. Outras células tumorais que não se utilizam da glicólise aeróbia, podem ser induzidas a morte pela metformina pela redução do ATP (36,100,112,114).

Além disso, esse fármaco pode influenciar no controle tumoral por meio da regulação na síntese de ácidos graxos dependente da ativação da AMPK. A enzima ácido graxo sintase (FAS) é essencial na biossíntese de ácidos graxos e apresenta-se aumentada em células tumorais. A literatura demonstra que a ativação da AMPK reduz a expressão de FAS e, consequentemente, o crescimento tumoral (36,99,100,112,114).

Ainda, a metformina apresenta influencia na inflamação crônica ocasionada pelo tumor. Hirsch et al., (2013) relataram que a ativação da AMPK inibe a síntese de citocinas pró-inflamatórias em diversos tipos de células, sugerindo uma possível redução da inflamação ocasionada pelo tumor com a administração de metformina. Tal diminuição do quadro inflamatório se deve a inibição da ativação do fator nuclear *kappa* B (NF-κB) e diminuição da concentração da proteína C-reativa.

Por último, a metformina pode promover um importante efeito no crescimento e na metástase tumoral pela inibição da migração celular e angiogênese. Sabe-se que a angiogênese é fator importante para o processo de crescimento tumoral e a administração de metformina diminui os estímulos pró-angiogênicos e inflamatórios, como TNF-α e a ativação do NFκB, reduzindo o fator de crescimento vascular endotelial (36,97,99,105,115).

Além disso, a ativação da AMPK induzida pela metformina apresenta papel importante na via do VEGF para inibição da angiogênese. Essa inibição ocorre ainda de forma seletiva, acometendo apenas as células tumorais. É postulado na literatura que a inibição da mTOR (*mammalian target of rapamycin*) pela AMPK é a principal razão para a inibição da angiogênese (36,99,100,115,116).

Outra forma com que a administração de metformina reduz a angiogênese é pela redução no recrutamento de neutrófilos. Sabe-se que os neutrófilos apresentam papel importante no processo inflamatório e na secreção de diversos fatores pró-angiogênicos como o VEGF (99,100,105,114,116).

Diversos estudos demonstram ainda que a metformina pode aumentar a sensibilidade aos tratamentos quimioterápicos, demonstrando ser um promissor agente coadjuvante para o tratamento do câncer. Adicionalmente, a metformina pode ser benéfica quando administrado juntamente com os quimioterápicos, pois apresenta

efeitos protetores para alguns efeitos colaterais como a cardiotoxicidade ocasionado pelo uso da doxorubicina (66,105,112,114,117).

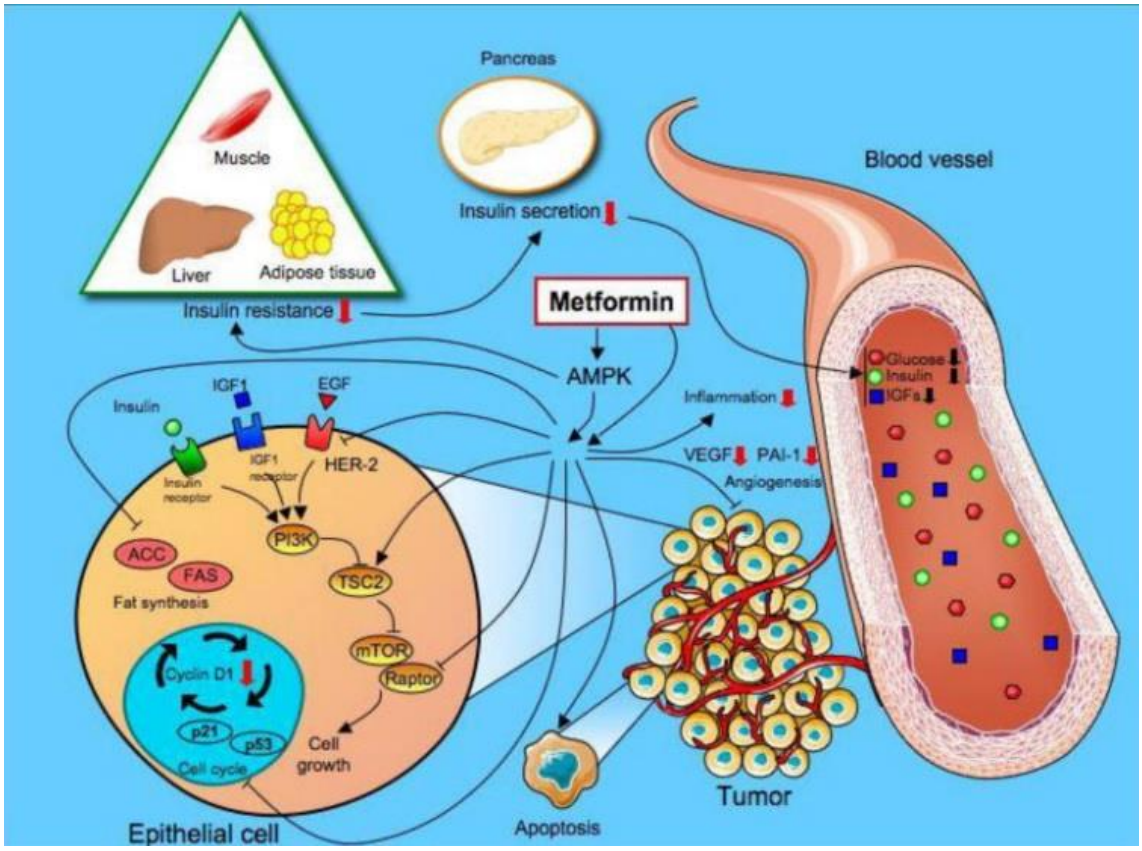

Figura 8 - O controle da proliferação e crescimento celular pela metformina. A metformina inibe o crescimento das células cancerígenas por atenuar a hiperglicemia, hiperinsulinemia e resistência à insulina, diminuindo assim, os níveis de glicose, insulina, IGF e as vias de sinalização de crescimento celular. Todos esses mecanismos são regulados pela ativação da AMPK.

Apesar desses benefícios, a metformina apresenta alguns efeitos colaterais como à acidose metabólica e anorexia. A acidose metabólica promovida pela metformina é definida como uma elevação do lactato sanguíneo, ocasionando acidose em pacientes tratados com metformina. Apesar de ser uma condição rara, a literatura estima 10 casos para cada 100 mil pacientes que utilizam esse medicamento, o acúmulo da acidose metabólica provocada pela metformina pode aumentar a mortalidade (de 30% a 50%) destes pacientes e os casos continuam a ser relatados e com maior frequência (118–120).

A acidose metabólica pela metformina acomete principalmente os pacientes que apresentam desidratação, vômito, diarréia e cirurgia. Todos esses sintomas são frequentes em pacientes caquéticos. Esses sintomas estão relacionados com a

diminuição da remoção da metformina, culminando em aumento dos níveis plasmáticos desta (99,118,120).

Estudos relatam que indivíduos com pré-disposição a desenvolver acidose metabólica, como é o caso do efeito Warburg ocasionado pelo tumor, a administração com metformina pode ser um potencial fator de risco (118,121,122).

Em condições normais, a acidose metabólica é caracterizada por baixo pH do sangue e elevada concentração de lactato arterial. O lactato é produzido em diversos tecidos, tais como, intestino, fígado e tecidos periféricos durante a glicólise e condições de hipóxia (99,118,121).

O lactato é oxidado em dióxido de carbono e água pela mitocôndria para a geração de energia ou convertido em glicose pelo fígado e rim pelo processo de gliconeogênese (118,120,122).

A acidose metabólica ocasionada pela metformina ocorre em condições onde a produção de lactato é aumentada, ao mesmo tempo em que sua remoção pela oxidação ou gliconeogênese é drasticamente reduzida. Além disso, o aumento do lactato é dependente, principalmente, da dose e da concentração plasmática de metformina (120,122,123).

É relatado na literatura que um dos mecanismos em que a metformina aumenta a concentração plasmática de lactato é pela inibição do complexo 1 da cadeia respiratória mitocondrial nos tecidos, responsável pela remoção do lactato (36,98,99,120).

O complexo mitocondrial 1 é importante para a cadeia respiratória e na fosforilação oxidativa, pois além de produzir energia na forma de ATP, ele oxida as moléculas NADH, que são produzidas no ciclo de Krebs e na β-oxidação, regenerando as moléculas de NAD^+ e controlando o pH intracelular (95,98,118,120).

Tal inibição resulta na diminuição do metabolismo energético celular e uma diminuição da cadeia respiratória mitocondrial, podendo aumentar, dessa forma, a produção de lactato. (95,118,120).

Essa inibição do complexo mitocondrial 1 resulta em uma redução do aporte energético, alterando o balanço entre a produção e o consumo de ATP, reduzindo

assim, a razão ATP/AMP e ativando a AMPK. A estimulação da AMPK pela metformina se dá pela inibição da AMP desaminase, resultando em aumento da AMP e, consequentemente, ativando a AMPK. A ativação da AMPK é responsável pelo aumento da captação de glicose pelo GLUT-4 no músculo esquelético (36,95,99,120).

Ainda, a metformina administrada via oral, consegue atravessar a barreira hemato-encefálica, sugerindo que seu efeito anorexígeno possa ser por meio de uma ação direta sobre os centros regulatórios de sensação de fome/saciedade no hipotálamo (83,100,124).

É relatado na literatura que a administração de metformina pode reduzir a ingestão de alimentos em indivíduos diabéticos e não diabéticos. Evidências sugerem que seu potencial efeito anorexígeno é resultado de ação específica no centro regulatório de sensação de fome e saciedade no hipotálamo. Contudo, os mecanismos ainda estão sendo investigados (92,124–126).

Aubert el al., (2011) demonstrou que a administração de metformina por 2 semanas em ratos alimentados com uma dieta rica em gorduras induziu há uma significativa redução da ingestão de alimentos e perda de peso em todos os animais. Somado a esse fator, houve também um aumento nos níveis plasmáticos de leptina.

Dados da literatura demonstram que a AMPK apresenta importante papel na regulação da população de neurônios que controlam a sensação de fome/saciedade, pois age como um sensor e regulador da homeostase energética, sinalizando o estado metabólico para o hipotálamo e regulando a sensação de fome/saciedade. Ainda, evidências demonstram que a AMPK é altamente expressa no hipotálamo (83,100,126,127).

O controle da ingestão alimentar pode ser modulado pela AMPK, mas há um conflito entre os estudos sobre sua ação no controle da ingestão alimentar. Há estudos relatando que a metformina diminui a pAMPK no hipotálamo (Chau-Van et al., 2007) e outros estudos relatando que a metformina aumenta a pAMPK no hipotálamo (Ropelle et al., 2007). Sendo necessários mais estudos para o melhor entendimento desses mecanismos.

López et al., (2008) e Minokoshi et al., (2004) relatam que o estado de jejum pode aumentar a atividade da AMPK no hipotálamo, a ativação da AMPK no hipotálamo induziu a sensação de fome e ganho de peso corporal. Enquanto sua inibição promoveu sensação de saciedade e perda de peso corporal.

Lee et al., (2012) verificaram a infusão de metformina diretamente no cérebro dos animais por meio de cateter e analisaram que houve aumento da pAMPK e aumento na expressão do neuropeptídio POMC e uma diminuição na expressão do neuropeptídio NPY.

Um estudo demonstrou que a administração central de grelina aumentou a fosforilação de AMPK e uma redução na fosforilação da mTOR, induzindo a expressão de NPY e AgRP. Porém, quando foi administrado metformina, houve uma redução significativa na fosforilação de AMPK e um aumento na fosforilação de mTOR, sugerindo assim, que há uma interferência na sinalização da AMPK pela grelina, demonstrando um potencial efeito anoréxico da metformina (83,124,128).

A redução da fosforilação da AMPK no hipotálamo leva há uma redução na ingestão de alimentos e há um aumento na atividade da mTOR, indicando que o efeito anoréxico da metformina é dependente da fosforilação da AMPK ou não (83,124,128).

Apesar dos efeitos colaterais ocasionados pelo uso crônico da metformina, esse fármaco demonstra um potencial efeito antitumoral, podendo ser utilizado como uma terapia alternativa para o tratamento do câncer. Ainda, quando associada à suplementação com β-alanina, pode apresentar resultados promissores para um tratamento alternativo, com menor efeito colateral, para o câncer (83,129–131).

4 β-ALANINA

A β-alanina é um aminoácido não essencial sintetizado naturalmente e encontrado no músculo esquelético e é um dos principais componentes de diversos suplementos alimentares. É um dos precursores e o grande fator limitante para a síntese da carnosina. A β-alanina é largamente utilizada e estudada como um recurso ergogênico, devido ao seu efeito de tamponamento da acidose metabólica (44,132,133).

É relatado que o estresse biológico aumenta a concentração de β-alanina. Em diversos tecidos, inclusive nos mamíferos, este aminoácido apresenta função protetora contra a lesão celular induzida pelo exercício físico (139–141). Em plantas, a β-alanina protege contra o estresse osmótico.

Esse aminoácido possui como principal característica o tamponamento da acidose metabólica. A acidose metabólica, ocasionada tanto pelo músculo esquelético quanto pelo tumor, eleva a produção de ácido lático que se dissocia rapidamente em íons H^+ e lactato, alterando os valores de pH fisiológico. A β-alanina pode ser aceptor de prótons durante a liberação excessiva pela glicólise (132,134).

Tal efeito, tanto para a β-alanina quanto para a carnosina, deve-se ao anel imidazol, que é um aceptor de íons H^+ durante a acidose metabólica (134,135).

O principal objetivo da suplementação da β-alanina é aumentar os estoques intramusculares de carnosina. Estudos relatam que doses seguras (10 mg/kg/dia) são suficientes para aumentar de forma significativa os estoques de carnosina e sua dose diária é limitada em cerca de 800 mg por dia, doses diárias acima desse valor podem causar alguns efeitos colaterais como parestesia e enxaqueca. Ainda, alguns autores relatam que a β-alanina em excesso pode ser oxidada e contribuir para a produção de energia pelas células (132,136,137).

Diversos estudos demonstram que diferentes doses aumentam de forma significativa os estoques de carnosina, sendo que esses estoques permanecem altos por até nove semanas após a interrupção da suplementação com β-alanina (138–140).

Os benefícios da suplementação de β-alanina para âmbito competitivo são diversos, tais como, aumento da potência anaeróbia, aumento da força muscular, retardo da fadiga e do acúmulo de lactato sanguíneo (133,141–143).

Contudo, recentemente um estudo demonstrou que a β-alanina possui efeito antitumoral. Vaughan et al., (2014) demonstraram que a β-alanina conseguiu reduzir significativamente a glicólise de células tumorais e o microambiente ácido produzido pelo tumor. Somado a isso, a β-alanina conseguiu reduzir de forma seletiva o metabolismo oxidativo das células tumorais.

Ainda, esse mesmo grupo relatou que esse aminoácido reduziu a expressão de genes relacionados à via glicolítica, como a lactato desidrogenase (LDH). Além disso, inibiu a proliferação celular reduzindo a viabilidade celular e demonstrou ainda, um aumento na sensibilidade ao quimioterápico, como a doxorubicina (44).

Esses efeitos benéficos da β-alanina frente às células tumorais, pode ter uma participação efetiva da carnosina, uma vez que a β-alanina é um aminoácido precursor de sua síntese e todos os efeitos relatados com a β-alanina, são vistos também com a suplementação com carnosina (44,133).

A carnosina é um dipeptídeo formado pela união dos peptídeos β-alanina e L-histidina, sintetizado predominantemente nas células musculares esqueléticas (cerca de 99%), ela está ausente em plantas e invertebrados, sua concentração vária de acordo com a idade, sexo, tipo de fibra muscular e da dieta. O fator limitante da síntese deste dipetídeo é a β-alanina (133,144,145).

Sua síntese é realizada pela enzima carnosina sintase (ou sintetase), apresentando alta atividade no músculo esquelético e regiões específicas do cérebro, como o bulbo olfatório. Sua hidrólise ocorre por meio de duas enzimas: carnosinase plasmática (CN1), que apresenta alta atividade, e carnosinase tecidual (CN2), sendo que a enzima carnosinase plasmática é ausente em roedores. (135,146,147).

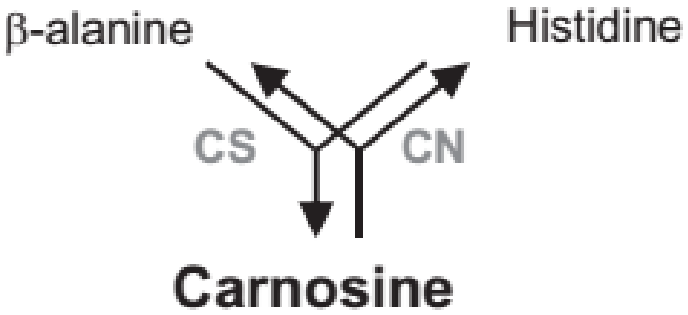

Figura 9 - Metabolismo da carnosina. A síntese da carnosina depende da enzima carnosina sintase (CS), sintetizando a carnosina a partir dos peptídeos β-alanina e L-histidina. A sua degradação depende da enzima carnosinase (CN), clivando-a em β-alanina e L-histidina novamente.

Esse dipeptídeo, assim como seu precursor, é largamente estudado no exercício físico, sua principal função é o tamponamento da acidose metabólica e sabe-se que ele modula o sistema nervoso periférico afetando o controle autônomo do pâncreas, rim, tecido adiposo e a pressão sanguínea (135,146,147).

É relatado na literatura que está proteína, além das funções citadas acima, apresenta efeitos terapêuticos, tais como, diminuição do risco de nefropatia diabética e da diabetes, do risco de desenvolver doenças cardiovasculares, e demonstra ainda, um potencial antioxidante e antiinflamatório (133,148–151). Tanto é verdade que pesquisadores tem verificado sua eficácia para o combate ou prevenção de diversas doenças crônicas e neurodegenerativas tais como Parkinson e Alzheimer (135,152,153)

Estudos mais recentes indicam que este dipeptídeo apresenta um potencial profilático e eficiente no tratamento de câncer, promovendo retardo/controle do crescimento tumoral (137,149,154,155). Tais efeitos não resultam de apoptose ou necrose, mas sim de uma redução na taxa de proliferação do tumor (136,137,149).

Asperger et al., (2011) e Renner et al., (2010) observaram que este efeito inibitório no crescimento tumoral se deve a uma inibição seletiva na ressíntese de ATP, sugerindo assim, um possível efeito no bloqueio das vias energéticas do tumor. Tal efeito deve-se há uma interferência na glicólise aeróbia promovida pelo tumor (137,149,156).

Shen et al., (2014) demonstraram que cultura de células tumorais tratadas com carnosina apresentaram redução na proliferação celular de cerca de 39% quando comparadas ao grupo controle. Essa redução foi devida ao fato da suplementação de

carnosina ter levado a redução do aporte energético para as células tumorais, diminuindo o consumo de oxigênio pelas células tumorais e a acidose extracelular ocasionada pelo tumor. Além disso, a glicólise também é afetada pela carnosina, podendo haver uma redução de aproximadamente 62% quando comparado ao controle, reduzindo dessa maneira, o aporte energético do tumor (149).

Outro fator que pode explicar a diminuição da proliferação é que a carnosina pode interromper o ciclo celular, afetando também a vida útil das células tumorais. No entanto, o efeito anti-proliferativo da carnosina não é devido à citotoxicidade, e sim de uma interrupção na transição da fase G1 para fase S do ciclo celular (137,157).

Ainda, a suplementação de carnosina é seu efeito anti-inflamatório. De fato, Son et al., (2008) demonstraram por meio de cultura de células intestinais que esse dipeptídeo inibiu a produção da citocina inflamatória IL-8, porém a expressão gênica desta citocina não sofreu alteração.

Outros estudos mostraram as ações anti-inflamatórias da carnosina, com redução na produção das citocinas inflamatórios, tais como a IL-1β, IL-6, IL-8 e TNF-α (153,157,158). De acordo com Son et al., (2008) a carnosina inibiu a produção e secreção de IL-8, mas não alterou a expressão do mRNA desta citocina.

Tal efeito inibitório da carnosina na produção de citocinas deve-se a diminuição da fosforilação do complexo que regula a tradução, o eIF4E, contribuindo para a diminuição da tradução do mRNA das citocinas inflamatórias (136,152,158).

Dados obtidos no mestrado (não publicados) demonstram a ação da carnosina no controle do crescimento tumoral e no perfil inflamatório de ratos portadores de tumor.

Na figura 09, analisamos que o grupo controle portador de tumor (CT) apresentou uma redução no peso corporal em comparação ao grupo controle (C) (269,72 ± 4,75 g vs 308,96 ± 8,33 g, respectivamente; $p<0,05$). Quando suplementamos os animais com carnosina (ST) o peso corporal foi similar ao C (295,91 ± 7,95 g). Ainda, o peso tumoral no grupo ST apresentou uma redução em relação ao CT (5,28 ± 1,23 g vs 26,39 ± 3,92 g, respectivamente; $p<0,01$).

O consumo alimentar e hídrico mostrou diminuição no CT em relação ao C (Consumo de ração 17.37 ± 0.52 g vs 23.73 ± 0.60 g, respectivamente; *p*<0.001; Consumo de água 31.75 ± 1.02 mL vs. 46.26 ± 1.42 mL, respectivamente; *p*<0.001). Quando suplementamos os animais com carnosina (ST), o consumo de ração foi semelhante ao grupo C (Consumo de ração 28.18 ± 1.08 g; Consumo de água 57.42 ± 2.55 mL). O grupo suplementado controle (SC) foi semelhante ao C.

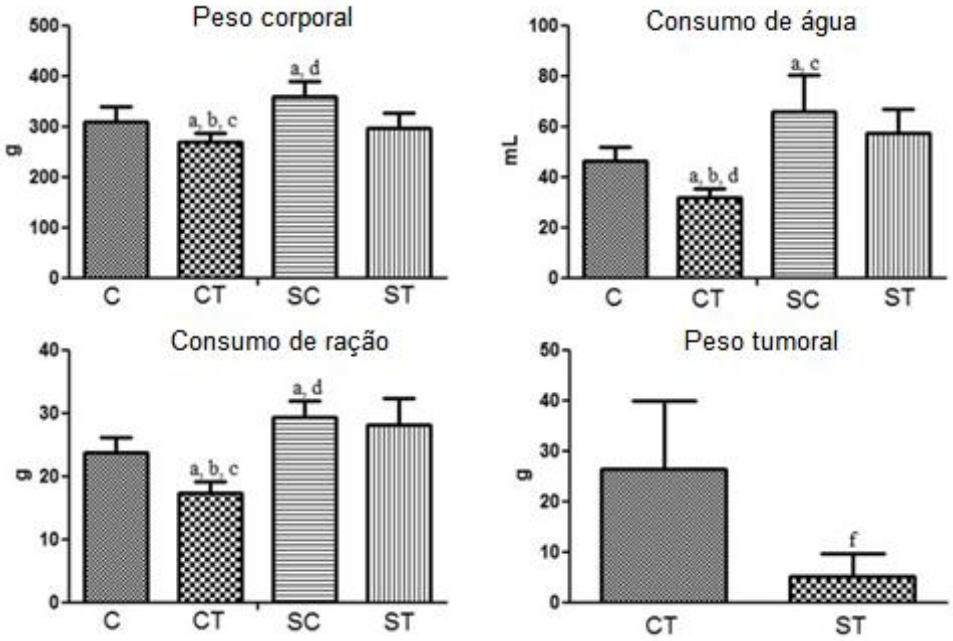

Figure 10 - Peso corporal, consume de ração e água e peso tumoral do grupo controle (C), grupo controle suplementado com carnosina (SC), grupo de animais portadores de tumor (CT) e grupo de animais portadores de tumor suplementados com carnosine (SC), n=10. Os valores são expressos em média ± SE. Significância ao [a] p < 0.001 comparado ao C. Significância ao [b] p < 0.001 comparado ao SC. Significância ao [c] p < 0.05 comparado ao ST. Significância ao [d] p < 0.001 comparado ao ST. Significância ao [e] p < 0.01 comparado ao C. Significância ao [f] p < 0.001 comparado ao CT.

Na análise da expressão gênica, as citocinas inflamatórias TNF-α e IL-6 apresentaram-se aumentadas em relação aos demais grupos. Em relação a IL-1β, o grupo ST demonstrou uma redução em relação ao grupo CT. Já a IL-10 apresentou-se aumentada em todos os grupos (figura 11)

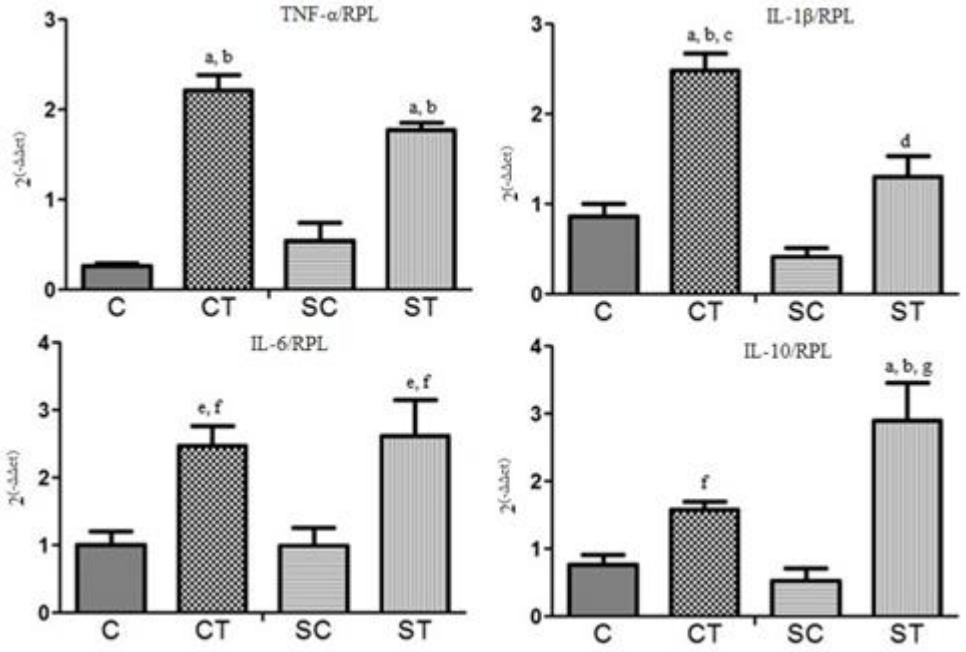

Figura 11 - Análise da expressão gênica das citocinas no hipotálamo do grupo controle (C), grupo controle suplementado com carnosine (SC), grupo de animais portadores de tumor (CT) e grupo de animais portadores de tumor suplementados com carnosine (SC), n=10. Os valores são expressos em média ± SE. Significância de [a] $p < 0.001$ comparado ao C. Significância de [b] $p < 0.001$ comparado ao SC. Significância de [c] $p < 0.001$ comparado ao ST. Significância de [d] $p < 0.01$ comparado ao SC. Significância de [e] $p < 0.05$ comparado ao C. Significância de [f] $p < 0.05$ comparado ao SC. Significância de [g] $p < 0.01$ comparado ao CT.

Quando analisamos a expressão proteica das mesmas citocinas (figura 12), notamos um aumento na expressão da citocina IL-1β no grupo CT em relação ao grupo C. O grupo ST não demonstrou nenhuma diferença quando comparado com os grupos controles. As demais citocinas (TNF-α, IL-6 e IL-10) não apresentaram diferenças entre os grupos.

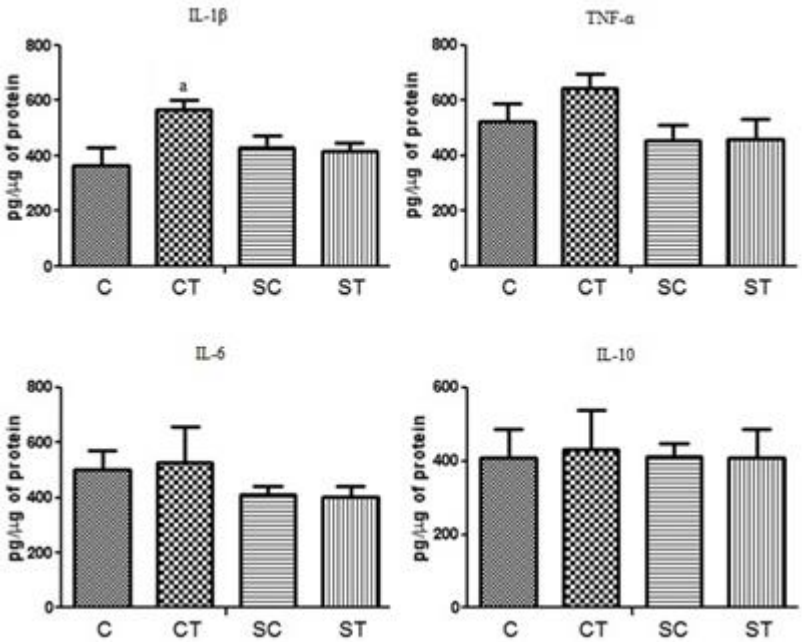

Figura 12 - Análise da expressão proteica das citocinas no hipotálamo do grupo controle (C), grupo controle suplementado com carnosine (SC), grupo de animais portadores de tumor (CT) e grupo de animais portadores de tumor suplementados com carnosine (SC), n=10. Os valores são expressos em média ± SE. Significância de [a] $p < 0.05$ comparado com C.

Sendo assim, a hipótese do presente estudo se baseia no potencial efeito que a administração de metformina e da suplementação de β-alanina podem apresentar na diminuição do estado inflamatório, atuando na inflamação hipotalâmica, na secreção de citocinas, bem como atuando na diminuição do tamanho do tumor e na possível atenuação da anorexia ocasionada pelo desenvolvimento do quadro de caquexia.

5 JUSTIFICATIVA

As drogas utilizadas atualmente são inespecíficas e antigas, sendo de extrema relevância o estudo de novas drogas que possam ser utilizadas como coadjuvantes no tratamento para o câncer. A metformina é um fármaco utilizado para o tratamento da diabetes e possui efeito antitumoral. A carnosina é eficiente em atenuar os sintomas da anorexia e sabe-se que a β-alanina é o principal fator limitante para sua síntese. Ainda, a suplementação de β-alanina aumenta os estoques intracelulares de carnosina. Este trabalho propõe investigar se a administração de metformina e a suplementação de β-alanina podem ser eficientes para o controle do crescimento tumoral e da anorexia e no controle do perfil inflamatório.

6 OBJETIVO

Analisar a ação da metformina e da β-alanina, no controle da produção das citocinas pró e anti-inflamatórias, na secreção dos neuropeptídios orexígenos e anorexígenos no hipotálamo e no crescimento tumoral

6.1 Objetivos Específicos

6.1.1 Analisar o efeito anti-anorexígeno da β-alanina ocasionado pelos efeitos da metformina e do tumor.

6.1.2 Determinar e quantificar as citocinas pró e anti-inflamatórias (IL-1ß, IL-6, IL-10 e TNF-α) no hipotálamo.

6.1.3 Examinar o efeito da suplementação sobre a secreção de leptina, fator fundamental na modulação da expressão de neuropeptídios anorexígenos e orexígenos.

6.1.4 Mensurar a produção e contribuição de citocinas pelo tumor.

7 CASUÍSTICA E MÉTODOS

7.1 Animais

Foram utilizados camundongos machos adultos, da linhagem C57BL6, fornecidos pelo Biotério Central do ICB/USP, com peso inicial variando entre 20-30 g. Os animais serão mantidos no Biotério de Experimentação do Departamento de Biologia Tecidual e Celular (ICB/USP) em regime de foto período 12 h claro: 12 h escuro (período claro iniciando-se às 7:00 h), temperatura de 23 ± 1 ^{0}C e receberam água e ração granulada balanceada (NUVILAB® CR1 – Nutri vital Nutrientes Ltda.) ad libitum.

Os procedimentos de manipulação experimental dos animais serão realizados de acordo com as normas estabelecidas no Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovado pela Comissão de Ética do Instituto de Ciências Biomédicas – USP, registrado sob nº 67, nas folhas 33, do livro 3.

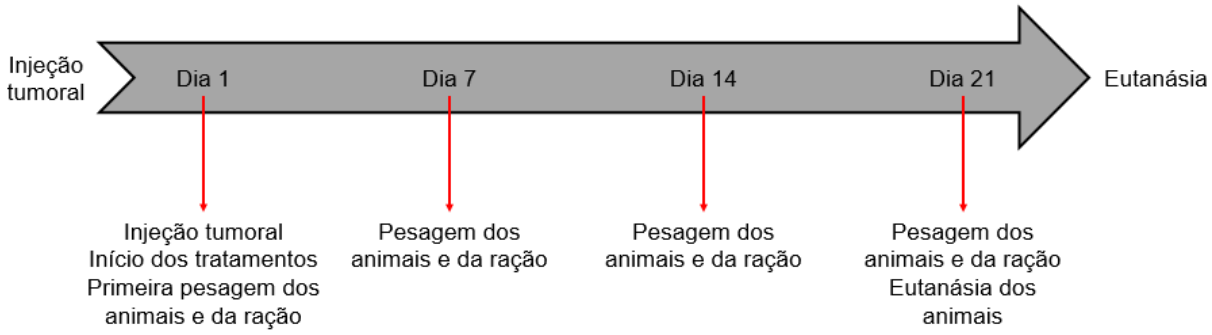

Figura 13 - Desenho experimental do trabalho, tendo início com a injeção tumoral nos animais. Os tratamentos foram realizados durante 21 dias.

7.2 Grupos experimentais

Os animais serão distribuídos nos seguintes grupos:

- Grupo de camundongos controle - **CT**
- Grupo de camundongos controle portadores de tumor - **CTB**
- Grupo de camundongos portadores de tumor suplementado com β-alanina – **TB**
- Grupo de camundongos portadores de tumor suplementado com metformina – **TM**
- Grupo de camundongos portadores de tumor suplementado com β-alanina e metformina - **TBM**

7.3 Tratamento

Os grupos experimentais receberão 10 mg/kg por dia de β-alanina ou 300 mg/kg por dia de metformina ou uma solução contendo β-alanina e metformina, sendo a administração das soluções via intragástrica. O consumo de ração será aferido, assim como o peso de todos os animais.

7.4 Implante tumoral

Células de carcinoma de pulmão de Lewis serão cultivadas em Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) contendo 10% de soro fetal bovino, 1% de 100 U/mL de penicilina e 100 lg/mL de estreptomicina e serão passadas a cada 3-4 dias. Para a injeção, as células serão diluídas em DMEM e injetadas nos animais.

7.5 Reação em cadeia da polimerase – Transcrição reversa (RT-PCR):

7.5.1 Extração do RNA Total:

A extração do RNA total do hipotálamo foi realizada utilizando o reagente Trizol® (Invitrogen, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante.

7.5.2 Obtenção do cDNA e amplificação dos genes de interesse por PCR:

Uma amostra de 5 µg de cada RNA foi submetida à reação de transcrição reversa com primers randômicos. Para isto, foi adicionado em cada amostra tampão da enzima, primers randômicos (150 ng) e a enzima SuperScript III (200 U; Invitrogen, EUA), em volume final de 20 µl. A partir dos cDNAs obtidos foram realizadas reações de PCR, amplificações de 40 ciclos, utilizando-se primers específicos para os genes das citocinas (IL-1β, IL-6, IL-10 e TNF-α), neuropeptídios (NPY e POMC), grelina e leptina, 10 pmol de cada primer em 100 µl de master mix, e a enzima GoTaq® Flexi DNA Polimerase (Promega, EUA), conforme instruções do fabricante.

7.7 Medida da concentração por método ELISA:

As amostras de hipotálamo foram lavadas em solução salina a 0.9% para remover qualquer contaminante existente. Sequencialmente, as mesmas foram picadas em 1 ml/100 mg de tecido em tampão RIPA e homogeneizadas com equipamento da marca Polytron. O homogenato foi centrifugado a 4 °C por 20 min a 15000×g, os sobrenadantes foram usados. A concentração de proteínas foi

determinada pelo método de Bradford. O ensaio quantitativo da concentração das citocinas (IL-1β, IL-6, IL-10 e TNF-α), neuropeptídios (NPY e POMC) e leptina foram realizados pelo método de ELISA (DuoSet ELISA, R & D Systems, MN, USA).

7.8 Análise estatística

Os resultados foram analisados pela ANOVA two way (controle X tumor; suplementado X não suplementado) e então considerado a interação entre A e B. Se um valor significativo for encontrado será conduzido a um pós-teste de Tukey. O nível de significância adotado será $P<0.05$.

8 RESULTADOS

8.1 Tratamento dos animais

O peso corporal dos animais ao longo do tempo está demonstra pela figura 13. Notamos que até o sétimo dia do implante tumoral os grupos mostravam-se semelhantes. A partir do décimo quarto dia, o grupo TM demonstrou uma diminuição significativa em relação ao grupo C. No vigésimo primeiro dia o grupo TM continuou com uma significativa redução de peso em relação aos grupos C e TMB.

Notamos que o tratamento com beta-alanina e o tratamento de metformina somado a beta-alanina preveniu a perda de peso, mantendo-se próximo ao peso corporal dos animais controles.

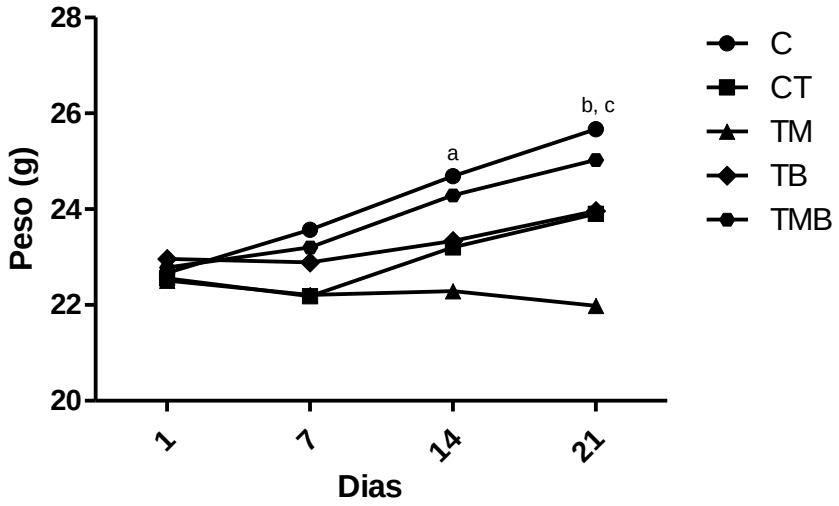

Figura 14 – Peso corporal dos animais ao longo do tempo. C: grupo controle (n=5), CT: grupo controle portador de tumor (n=5), TM: grupo tumor administrado com metformina (n=5), TB: grupo tumor suplementado com beta-alanina (n=5) e TMB: grupo tumor administrado com metformina e beta-alanina (n=5). a p<0,05 C em relação ao TM; b p<0,01 C em relação TM; c p<0,05 TMB em relação ao TM.

O consumo dos animais ao longo do tempo está demonstra pela figura 14. Notamos que a partir do décimo quarto dia, o grupo TM demonstrou uma diminuição significativa em relação ao grupo C e ao grupo TB. No vigésimo primeiro dia o grupo TM continuou apresentando redução no consumo em relação ao grupo C. O grupo CT também demonstrou uma redução no consumo alimentar em relação ao grupo C no vigésimo primeiro dia. Curiosamente, o grupo TB aumentou o consumo de alimentos.

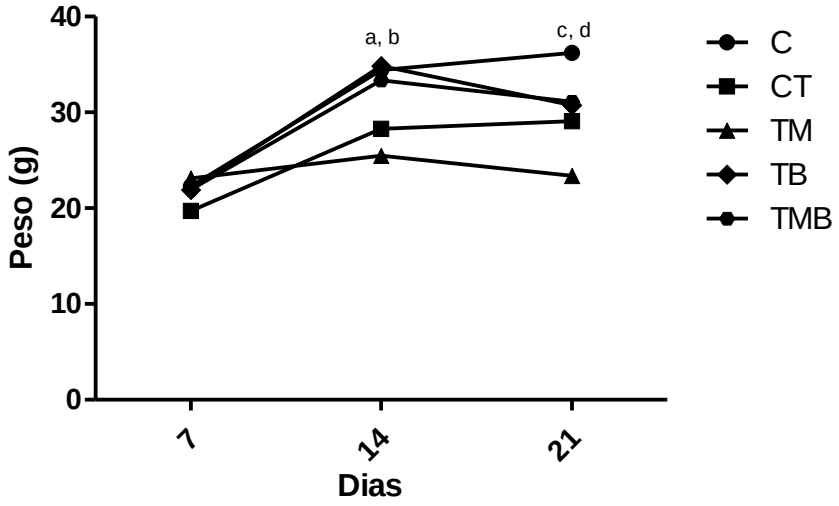

Figura 15 – Consumo de ração dos animais ao longo do tempo. C: grupo controle (n=5), CT: grupo controle portador de tumor (n=5), TM: grupo tumor administrado com metformina (n=5), TB: grupo tumor suplementado com beta-alanina (n=5) e TMB: grupo tumor administrado com metformina e beta-alanina (n=5). a p<0,05 C em relação ao TM; b p<0,05 TB em relação TM; c p<0,05 C em relação ao CT; d p<0,01 C em relação ao TM.

Após o sacrifício dos animais e analisarmos o peso dos tecidos, não notamos nenhuma diferença estatística no peso dos tecidos entre os grupos (figura 15).

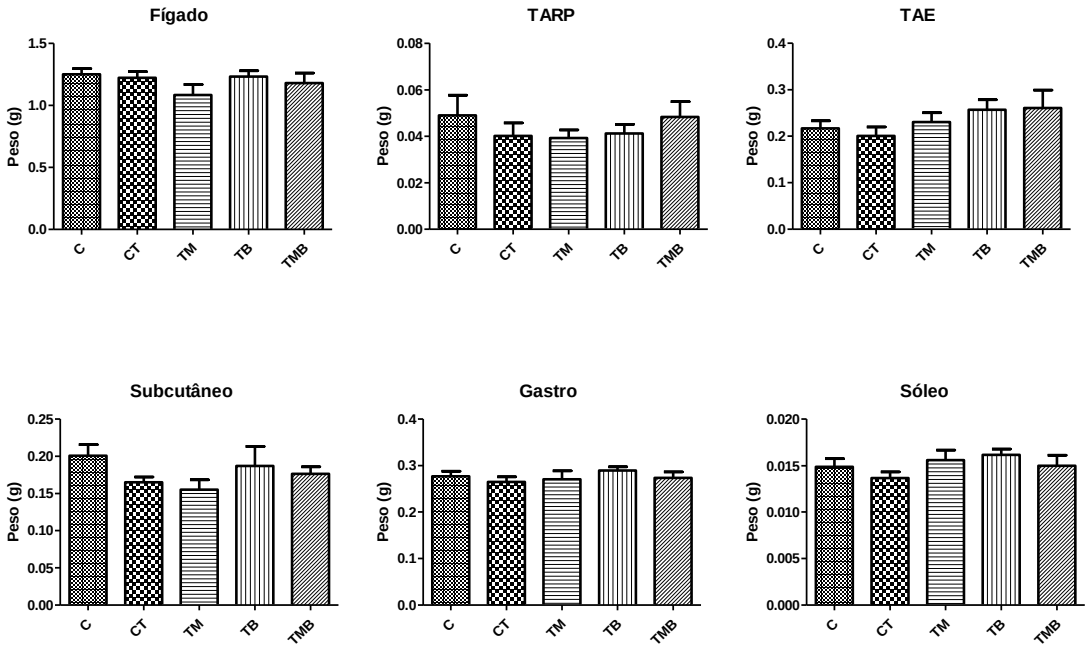

Figura 16 – Análise do peso dos tecidos dos animais. C: grupo controle (n=5), CT: grupo controle portador de tumor (n=5), TM: grupo tumor administrado com metformina (n=5), TB: grupo tumor suplementado com beta-alanina (n=5) e TMB: grupo tumor administrado com metformina e beta-alanina (n=5).

Contudo, quando analisamos o peso do tumor, notamos que o grupo TB apresentou uma massa tumoral maior que os demais grupos, demonstrando uma diferença significativa em relação ao grupo TMB (figura 16).

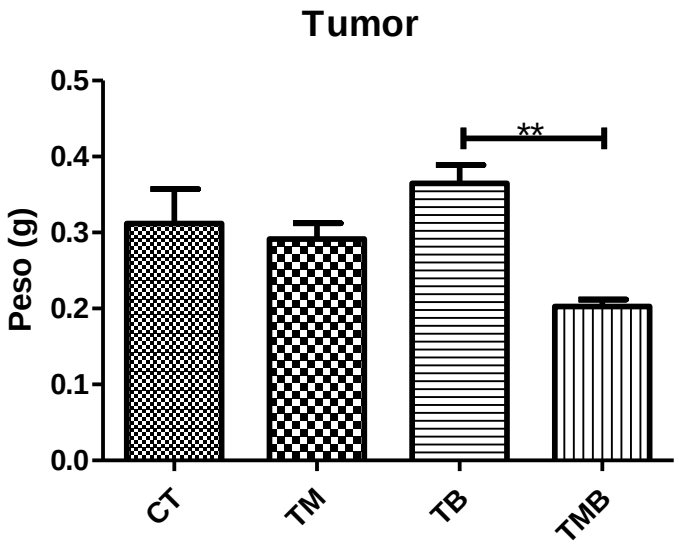

Figura 17 – Análise do peso do tumor dos animais. C: grupo controle (n=5), CT: grupo controle portador de tumor (n=5), TM: grupo tumor administrado com metformina (n=5), TB: grupo tumor suplementado com beta-alanina (n=5) e TMB: grupo tumor administrado com metformina e beta-alanina (n=5). ** p<0,01.

Analisamos ainda a concentração de lactato no soro dos animais e notamos que os grupos CT e TM apresentaram aumento significativo na concentração de lactato em relação aos demais grupos, o que foi revertido quando suplementamos esses animais com beta-alanina (figura 17).

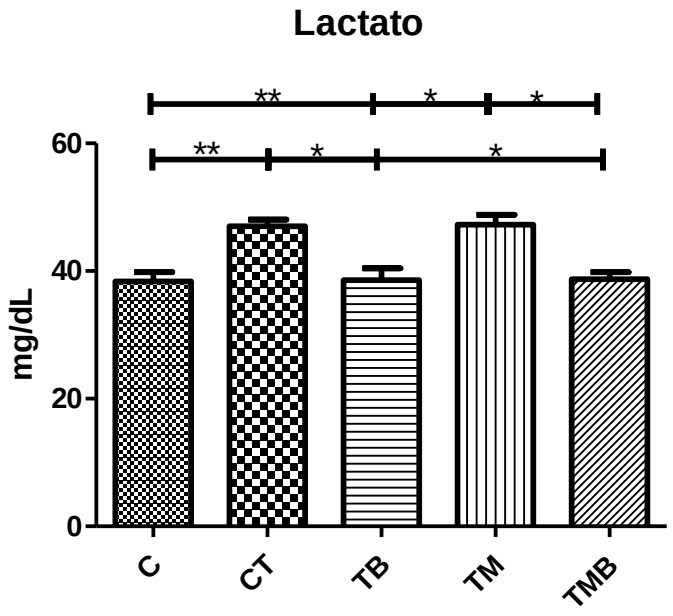

Figura 18 – Análise do lactato nos animais. C: grupo controle (n=5), CT: grupo controle portador de tumor (n=5), TM: grupo tumor administrado com metformina (n=5), TB: grupo tumor suplementado com beta-alanina (n=5) e TMB: grupo tumor administrado com metformina e beta-alanina (n=5). * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001.

8.2 Avaliação da expressão gênica e proteica no hipotálamo

Em concordância com os resultados obtidos de peso corporal e ingestão de alimentos, avaliamos a expressão gênica do hormônio leptina, responsável pela secreção dos neuropeptídios relacionados à sensação de fome/saciedade, e dos neuropeptídios relacionado à fome (NPY) e saciedade (POMC) (figura 18).

O hormônio leptina não apresentou diferença significativa entre os grupos. No entanto, observou-se uma redução significativa do NPY no grupo TM em relação aos grupos C e CT. O grupo TB também demonstrou uma redução da expressão de NPY em relação ao grupo CT.

Ao analisarmos a expressão de POMC, notamos que o grupo TM apresentou uma superexpressão em relação aos demais grupos. Contudo, o grupo TMB apresentou um pequeno aumento na expressão de POMC em relação aos grupos CT e TB e uma redução em relação ao grupo TM.

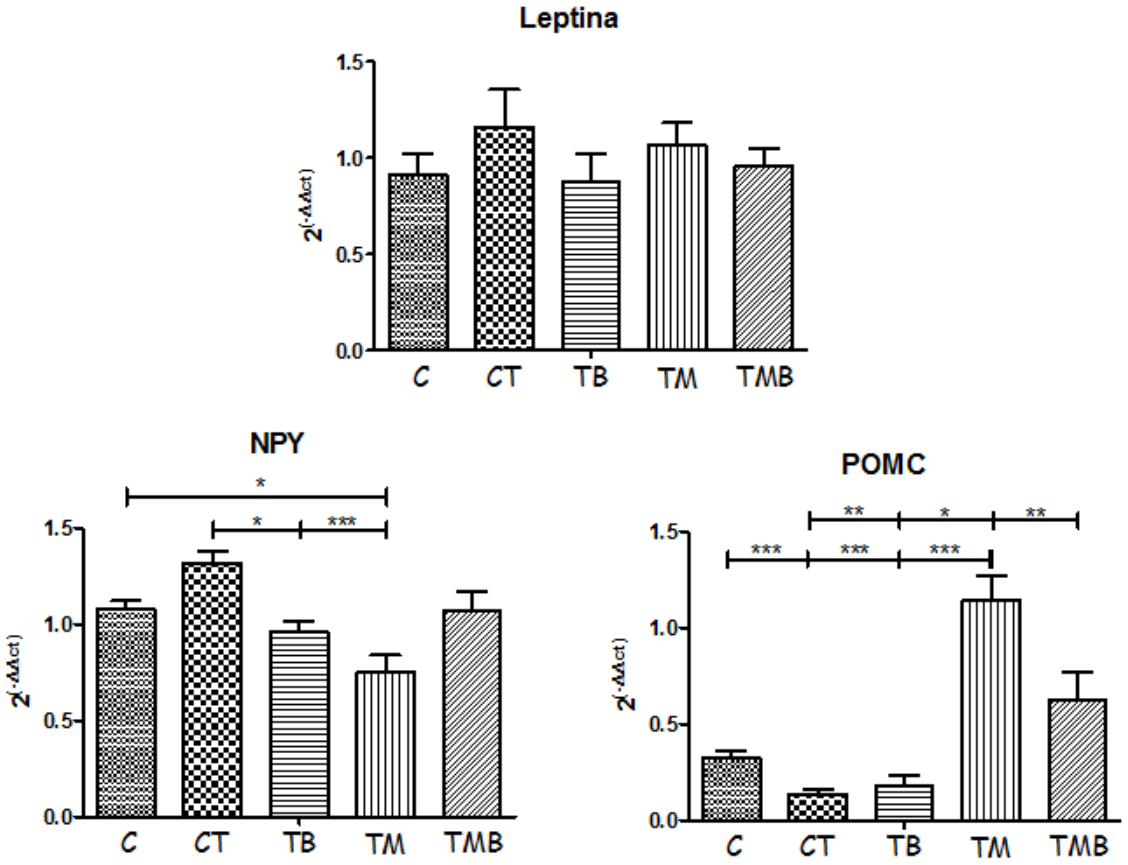

Figura 19 – Análise da expressão gênica de leptina e neuropeptídios reguladores do apetite no hipotálamo. C: grupo controle (n=5), CT: grupo controle portador de tumor (n=5), TM: grupo tumor administrado com metformina (n=5), TB: grupo tumor suplementado com beta-alanina (n=5) e TMB: grupo tumor administrado com metformina e beta-alanina (n=5). * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001.

Analisamos a expressão gênica e proteica das citocinas pró e anti-inflamatórias. Na IL-1β notamos que o grupo CT apresentou um aumento tanto na expressão gênica (em relação ao grupo C) quanto na proteica (em relação ao grupo TB), o que foi revertido com os tratamentos utilizados (figura 19).

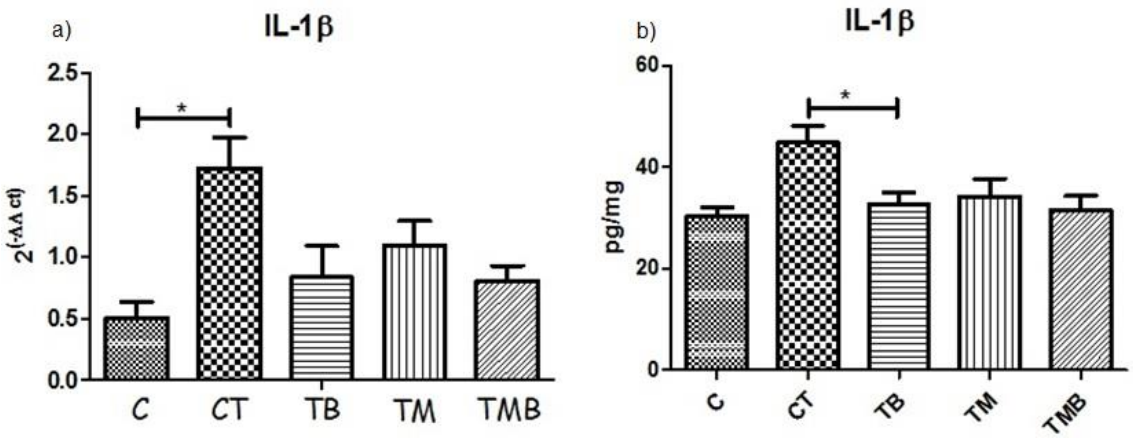

Figura 20 – a) Análise da expressão gênica; b) análise da expressão proteica. C: grupo controle (n=5), CT: grupo controle portador de tumor (n=5), TM: grupo tumor administrado com metformina (n=5), TB:

grupo tumor suplementado com beta-alanina (n=5) e TMB: grupo tumor administrado com metformina e beta-alanina (n=5). * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001.

A expressão gênica de IL-6 não demonstrou diferença entre os grupos. Contudo, ao analisarmos a expressão proteica, notamos um aumento significativo dessa proteína no grupo CT em relação aos grupos TB e TM (figura 20).

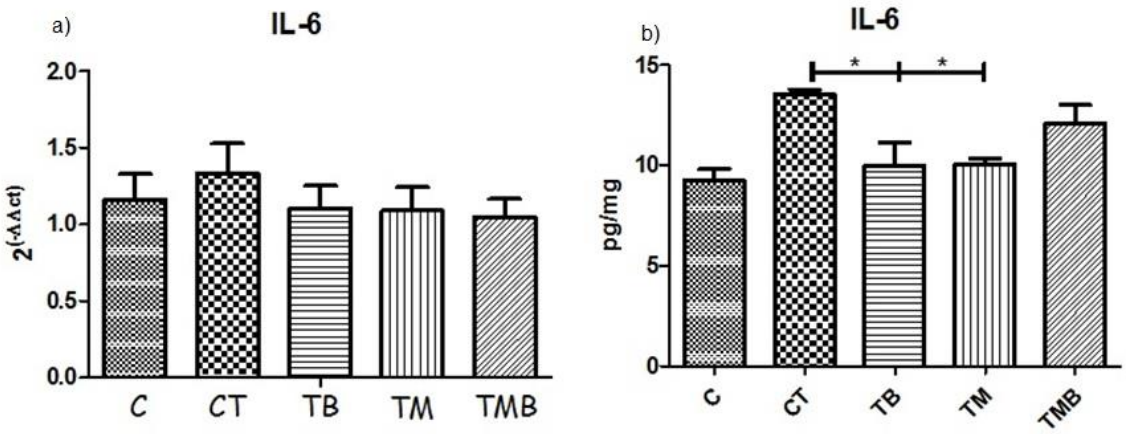

Figura 21 – a) Análise da expressão gênica; b) análise da expressão proteica. C: grupo controle (n=5), CT: grupo controle portador de tumor (n=5), TM: grupo tumor administrado com metformina (n=5), TB: grupo tumor suplementado com beta-alanina (n=5) e TMB: grupo tumor administrado com metformina e beta-alanina (n=5). * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001.

Ao analisarmos a expressão gênica da citocina TNF-α, notamos que houve um aumento no grupo TM em relação aos grupos C, CT e TB. Contudo, no que tange a expressão proteica o grupo CT demonstrou um aumento em relação aos demais grupos. Os grupos tratados demonstraram uma expressão proteica semelhante ao grupo C, como demonstra a figura 21.

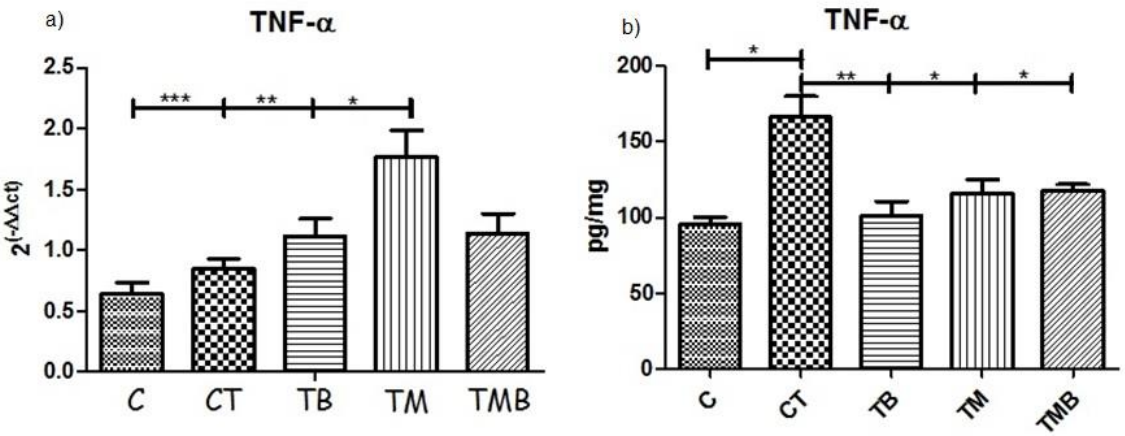

Figura 22 – a) Análise da expressão gênica; b) análise da expressão proteica. C: grupo controle (n=5), CT: grupo controle portador de tumor (n=5), TM: grupo tumor administrado com metformina (n=5), TB: grupo tumor suplementado com beta-alanina (n=5) e TMB: grupo tumor administrado com metformina e beta-alanina (n=5). * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001.

A expressão gênica da citocina anti-inflamatória IL-10, o grupo TB apresentou um aumento significativo em relação aos grupos C, CT e TMB. Porém, na análise da expressão proteica, o grupo TMB demonstrou um aumento em relação ao grupo C, como demonstrado na figura 22.

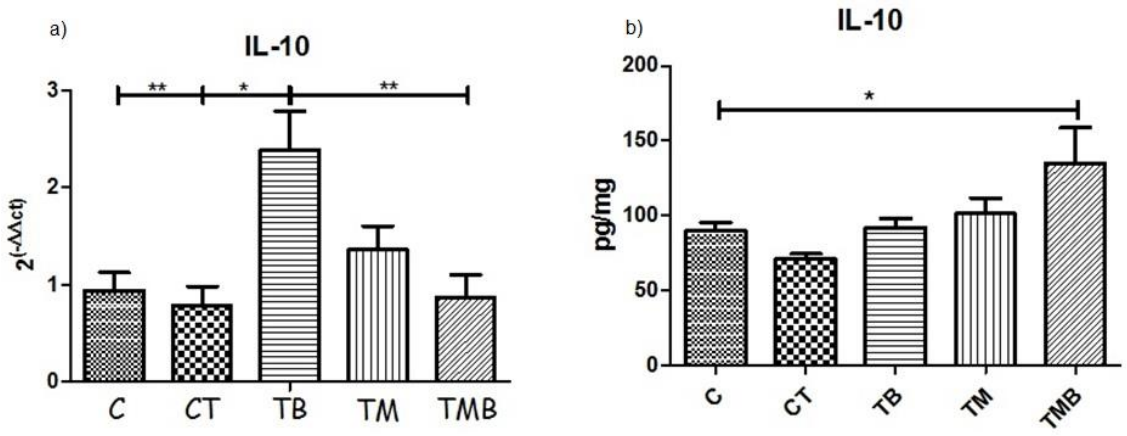

Figura 23 – a) Análise da expressão gênica; b) análise da expressão proteica. C: grupo controle (n=5), CT: grupo controle portador de tumor (n=5), TM: grupo tumor administrado com metformina (n=5), TB: grupo tumor suplementado com beta-alanina (n=5) e TMB: grupo tumor administrado com metformina e beta-alanina (n=5). * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001.

8.3 Avaliação da expressão gênica e proteica no tumor

Ao analisar a expressão gênica e proteica das citocinas pró e anti-inflamatórias no tumor, notamos que o grupo TM apresentou aumento na expressão gênica da citocina IL-1β em relação aos demais grupos. Ao vermos a expressão proteica, notamos que o grupo TB apresentou uma redução em relação ao grupo CT, o que não ocorreu com os grupos TM e TMB (figura 23).

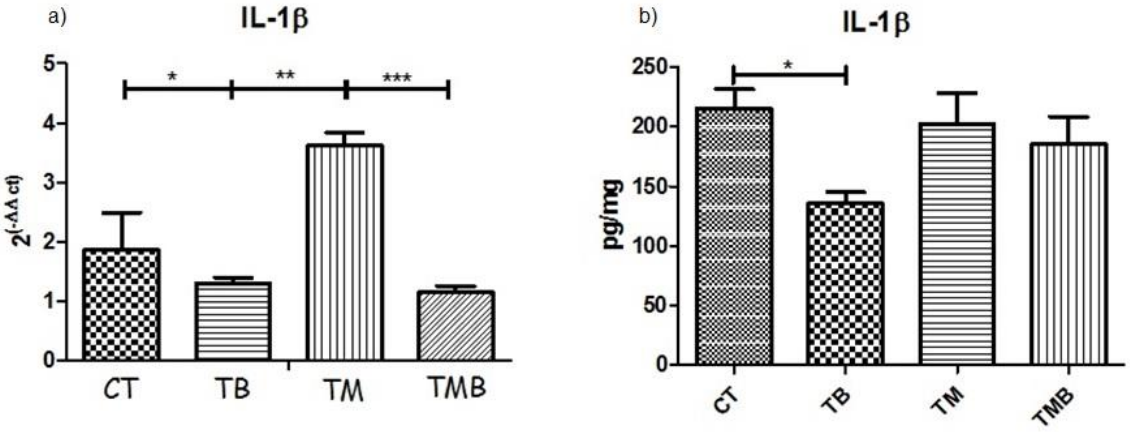

Figura 24 - a) Análise da expressão gênica; b) análise da expressão proteica. C: grupo controle (n=5), CT: grupo controle portador de tumor (n=5), TM: grupo tumor administrado com metformina (n=5), TB: grupo tumor suplementado com beta-alanina (n=5) e TMB: grupo tumor administrado com metformina e beta-alanina (n=5). * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001.

Na análise da IL-6, notamos que o grupo TM apresentou aumento tanto na expressão gênica (em relação aos demais grupos) quanto na expressão proteica (em relação aos grupos tratados TB e TMB). Já os grupos TB e TMB demonstraram uma redução na expressão proteica dessa citocina em relação ao grupo CT, como mostra a figura 24.

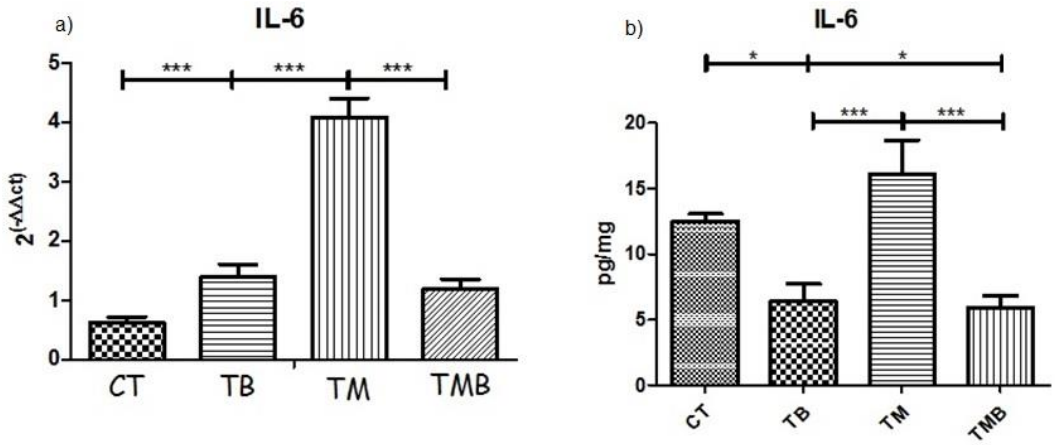

Figura 25 - a) Análise da expressão gênica; b) análise da expressão proteica. C: grupo controle (n=5), CT: grupo controle portador de tumor (n=5), TM: grupo tumor administrado com metformina (n=5), TB: grupo tumor suplementado com beta-alanina (n=5) e TMB: grupo tumor administrado com metformina e beta-alanina (n=5). * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001.

A expressão gênica da citocina TNF-α demonstrou um aumento significativo no grupo TM em relação aos demais grupos. Curiosamente, quando analisamos a expressão proteica, notamos que o grupo CT apresentou um aumento significativo em relação aos demais grupos (figura 25).

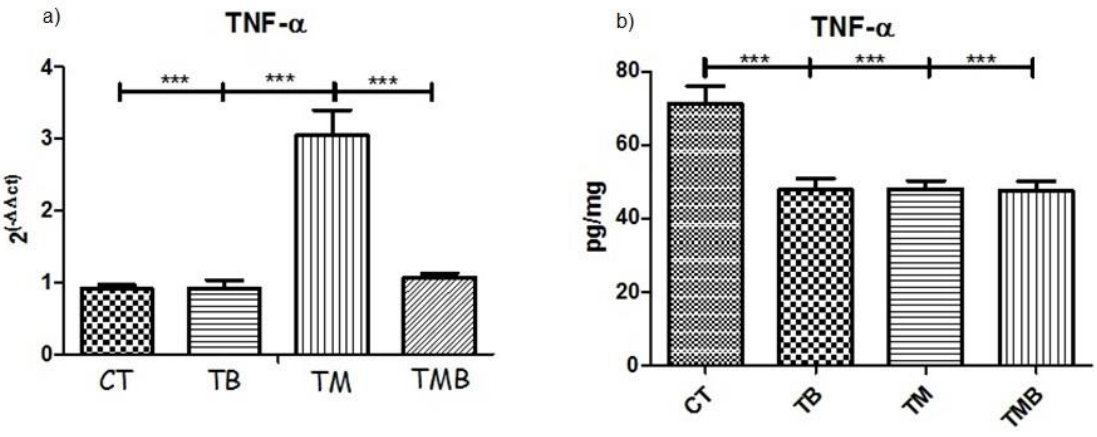

Figura 26 - a) Análise da expressão gênica; b) análise da expressão proteica. C: grupo controle (n=5), CT: grupo controle portador de tumor (n=5), TM: grupo tumor administrado com metformina (n=5), TB: grupo tumor suplementado com beta-alanina (n=5) e TMB: grupo tumor administrado com metformina e beta-alanina (n=5). * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001.

Por fim, ao analisarmos a citocina anti-inflamatória IL-10 (figura 26), notamos que a expressão gênica não apresentou diferença entre os grupos. Contudo, quando analisamos a expressão proteica, vimos que o grupo TMB apresentou um aumento significativo em relação aos demais grupos.

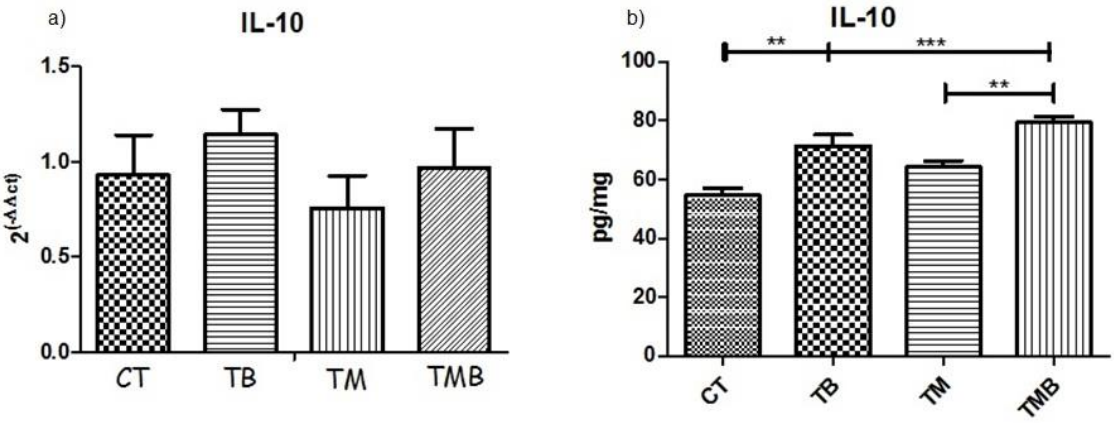

Figura 27 - a) Análise da expressão gênica; b) análise da expressão proteica. C: grupo controle (n=5), CT: grupo controle portador de tumor (n=5), TM: grupo tumor administrado com metformina (n=5), TB: grupo tumor suplementado com beta-alanina (n=5) e TMB: grupo tumor administrado com metformina e beta-alanina (n=5). * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001.

9 DISCUSSÃO

O câncer é uma doença que pode ocasionar anorexia, diminuição da ingestão de alimentos e acentuada perda de peso. Vimos que o tratamento com β-alanina foi eficiente no controle do peso corporal e da ingestão de alimentos. Ainda, todos os tratamentos foram efetivos no controle da inflamação no hipotálamo e no tumor (com exceção da IL-6).

É descrito na literatura que o modelo de carcinossarcoma utilizado (*Lewis Lung Cancer*) mimetiza os efeitos da caquexia. Contudo, nossos achados demonstraram que esse modelo tumoral não conseguiu mimetizar os efeitos da caquexia e também não ocasionou anorexia nesses animais. Ainda, como demonstrado na figura 15, não notamos nenhuma redução nos tecidos desses animais (159,160). Isto pode ter acontecido por dois motivos, primeiro deles é que os animais foram sacrificados com 21 dias, e os artigos que demonstram a caquexia nesse modelo veem essa síndrome se instalando em estágio mais avançado; Além disso, a agressividade do tumor pode variar dependendo da passagem em que se encontra a célula tumoral implantada.

Notamos ainda que os animais tratados com metformina demonstraram uma redução tanto no peso corporal quanto no consumo de ração. Estudos relatam que a metformina pode ocasionar anorexia e redução de peso (120,161).

Quando suplementamos os animais com β-alanina, notamos uma reversão da anorexia ocasionada pela metformina. Uma das causas para a anorexia provocada pela administração da metformina pode ser o aumento da acidose lática causa pelo uso crônico da metformina e mudanças na produção e liberação dos neuropeptídios orexígenos e anorexígenos (161–164).

De fato, a metformina pode inibir a consumo de alimentos por meio da modulação de NPY e POMC. Nossos resultados de peso corporal, ingestão de alimentos e na expressão gênica dos neuropeptídios vão ao encontro, com os achados na literatura (161,164,165).

Ao avaliarmos a expressão gênica do NPY, vimos uma redução na sua expressão quando administramos apenas metformina, o que foi revertido quando suplementamos esses animais com β-alanina. Duan et al., (2013) demonstraram que

três dias após a administração de metformina em camundongos, houve redução no consumo de ração e no peso corporal desses animais. Ainda, relataram que houve um aumento na pAMPK no hipotálamo e uma redução na expressão de NPY.

Ainda, Lee et al., (2012) relatam que a anorexia ocasionada pela metformina pode ter relação direta com a dose aplicada. Quanto maior for à dose aplicada, maior será a perda de peso e redução da ingestão de alimentos nos animais. Esse grupo demonstrou ainda que a metformina aumentou a expressão de POMC, o que corrobora com os nossos achados da expressão gênica de POMC.

Dessa forma, um dos mecanismos para a anorexia causada pela metformina é a sua ação direta no hipotálamo. Tanto é verdade, que a anorexia causada pela metformina é revertida após a interrupção do uso do medicamento (124,165).

O aumento da lactato causada pela metformina também pode induzir a anorexia. Nossos resultados demonstram que a metformina aumentou as concentrações de lactato no plasma dos animais, o que foi revertido com o uso da β-alanina. A redução do lactato nos animais tratados com β-alanina pode ter levado a regulação da ingestão de alimentos nesses animais (123,166–168).

É relatado na literatura que o aumento do lactato reduz a ingestão de alimentos e aumenta a concentração plasmática de glucagon. Ainda, o aumento do lactato induz a uma redução dos neuropeptídios orexígenos (NPY) e aumenta a concentração dos neuropeptídios anorexígenos (POMC) (169).

O aumento do lactato no hipotálamo inibe a fosforilação da AMPK e aumenta a atividade de ACC, induzindo a transformação de acetil-CoA em malonil-CoA. O aumento de malonil-CoA pode estimular o aumento na produção de POMC e CART e reduzir NPY e AgRP (170,171).

Além disso, tanto a metformina quanto a β-alanina administradas sozinhas não demonstraram uma ação muito eficaz no controle do crescimento tumoral. Contudo, quando administrado metformina e β-alanina houve uma redução no crescimento tumoral. É relatado na literatura que a metformina possui ação direta na inibição da proliferação celular e induz as células tumorais à morte pela inibição da atividade da mTOR. Essa inibição da mTOR se dá pela ativação da AMPK pela metformina.

Contudo, o aumento do lactato causado pela metformina pode diminuir a atividade da AMPK, aumentando dessa forma, a atividade da mTOR (170–172).

No caso da β-alanina, a literatura relata que o potencial efeito antitumoral é na formação da carnosina. De fato, diversos estudos relatam que a carnosina diminui o aporte energético para tumor, pela inibição da atividade do citocromo c. Além disso, reduz a produção de citocinas inflamatórias (135,136,149,155,158)

Contudo, um estudo recente demonstrou que a β-alanina possui um efeito sobre as células cancerígenas, diminuindo a acidose do microambiente tumoral, aumentando a sensibilidade aos fármacos utilizados para o combate ao câncer (44).

Quando administrados conjuntamente, a β-alanina conseguiu controlar a produção de lactato. Dessa forma, a metformina pode ter aumentado a atividade da AMPK, inibindo a atividade da mTOR, controlando dessa forma o crescimento tumoral (44,172)

Ainda, todos os tratamentos foram eficazes no controle da inflamação no tumor de camundongos tratados com metformina. Estudos relatam que a metformina inibe o NFκB e a proteína C-reativa (173).

A redução da inflamação tem ligação direta com a ativação da AMPK, que por sua vez, inibe a ativação do NFκB (p65). Isso faz com que haja uma redução tanto na expressão gênica quanto proteica das citocinas inflamatórias. Tal ação anti-inflamatória pode ser resultado de um efeito supressivo da metformina nos macrófagos (174,175).

Em nossos resultados, observamos que os tratamentos foram eficazes no controle da produção da citocina IL-1. Esta citocina é postulada como uma iniciadora e propagadora da inflamação, induzindo outras citocinas (TNF-α e IL-6) e aumentando a infiltração de células imunitárias em locais afetados, como o tecido tumoral. Além disso, no tumor, demonstra um papel importante na angiogênese, metástase, progressão e evasão tumoral. Quando age no hipotálamo ocasiona anorexia, sabe-se ainda que o hipotálamo apresenta diversos receptores para IL-1 (176,177).

O TNF-α é uma citocina que possui um papel importante na tumorigênese, pois está envolvida em diversos aspectos para a progressão tumoral, tais como: proliferação, angiogênese, invasão e metástase (178,179).

Já quando age no hipotálamo induz um potente efeito anoréxico, modulando a sinalização da leptina. Além disso, o TNF-α ativa a transdução de sinais pró-inflamatórios no hipotálamo (como o NFκB). Em nosso estudo notamos uma redução dessa citocina, tanto no hipotálamo quanto no tumor, nos animais tratados (180).

A IL-6 desempenha papel importante durante o processo inflamatório e também está envolvida no desenvolvimento e na progressão tumoral. Ainda, a literatura relata que a IL-6 está relacionada com o aumento da resistência do tumor aos fármacos. Tal fato pode explicar o aumento que houve na expressão de IL-6 no grupo tratado apenas com metformina (181,182).

Esta regula diversos genes relacionados na proliferação, sobrevivência e regulação do ciclo celular, facilitando e aumentando a resistência do tumor aos fármacos. Ainda, o aumento da acidose lática reduz o pH, ativando as proteases e aumentando a motilidade celular. A diminuição do pH também pode impedir a captação dos fármacos pelo tumor, reduzindo assim sua eficácia (44,181,182).

Por fim, a IL-10 tem como função suprimir a resposta inflamatória das células inibindo as citocinas pró-inflamatórias (como a IL-6 e TNF-α). Nossos resultados demonstraram que houve um aumento na expressão dessa citocinas quando tratamos os animais com metformina e β-alanina. Contudo, quando tratamos apenas com metformina, houve uma redução significativa dessa citocina no tumor. Tal fato pode contribuir para o aumento de IL-6 nesse tecido, quando tratamos os animais apenas com metformina (183,184).

10 CONCLUSÃO

Os tratamentos utilizados para o controle do crescimento tumoral e na influência da ingestão de alimentos demonstram um potencial para serem utilizados como tratamento coadjuvante para o tratamento do câncer. Os resultados obtidos de forma unitária, somente administração de metformina ou suplementação com β-alanina, demonstraram pouca eficácia. Contudo, quando administrados conjuntamente, metformina e β-alanina, demonstraram resultados promissores sem efeito colaterais.

REFERÊNCIAS*

1. INCA. Estimativa 2016 [Internet]. Ministério da Saúde Instituto Nacional de Cancer José Alencar Gomes da Silva. 2016. 124 p. Recuperado de: http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/sintese-de-resultados-comentarios.asp

2. INCA. Perfil da Assistência Oncológica, de 2007 a 2011. Inf Vigilância do Câncer. 2015;6:1–12.

3. Saúde M da. Oncologia: Manual de bases técnicas. Brasília-DF: Ministério da Saúde; 2015. 135 páginas.

4. Hornberg JJ, Bruggeman FJ, Westerhoff H V., Lankelma J. Cancer: A Systems Biology disease. BioSystems. 2006;83(2–3 SPEC. ISS.):81–90.

5. Korsunsky I, McGovern K, LaGatta T, Olde Loohuis L, Grosso-Applewhite T, Griffeth N, et al., Systems biology of cancer: a challenging expedition for clinical and quantitative biologists. Front Bioeng Biotechnol [Internet]. 2014;2(August):27. Recuperado de: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4137540&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

6. Kim SY. Cancer metabolism: Targeting cancer universality. Arch Pharm Res. 2015;38(3):299–301.

7. Jemal A, Vineis P, Bray F, Torre L, Forman D. O Atlas do Câncer [Internet]. 2014. 136 p. Recuperado de: http://we.tl/Uc2RVaxPDU

8. American Cancer Society. The History of Cancer. 2014;1–16. Recuperado de: http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/002048-pdf.pdf

9. Sawada NO, Nicolussi AC, Paula JM de, Garcia-Caro MP, Marti-Garcia C, Cruz-Quintana F. Quality of life of Brazilian and Spanish cancer patients undergoing chemotherapy: an integrative literature review. Rev Lat Am Enfermagem [Internet]. 2016;24:e2688. Recuperado de: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27192414

10. Ahmad SS, Reinius MA, Hatcher HM, Ajithkumar T V. Anticancer chemotherapy in teenagers and young adults: managing long term side effects. BMJ [Internet]. 2016;354(1):i4567. Recuperado de: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27604249

11. Greenplate AR, Johnson DB, Ferrell PB, Irish JM. Systems immune monitoring in cancer therapy. Eur J Cancer [Internet]. Elsevier Ltd; 2016;61:77–84. Recuperado de: http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2016.03.085

12. Kreuzaler P, Watson CJ. Killing a cancer: what are the alternatives? Nat Rev Cancer [Internet]. Nature Publishing Group; 2012;12(6):411–24. Recuperado de: http://dx.doi.org/10.1038/nrc3264

*De acordo com:
International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. [2011 Jul 15]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.htlm

13. Check DK, Basch EM. Appropriate Use of Antiemetics to Prevent Chemotherapy-Induced Nausea and Vomiting. JAMA Oncol [Internet]. 2016;9–11. Recuperado de: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2763179014. Iwamoto T. Clinical Application of Drug Delivery Systems in Cancer Chemotherapy : Review of the Efficacy and Side Effects of Approved Drugs. Biol Pharm Bulliten. 2013;36(May):715–8.

15. Kiernan J. Genetic Influence on Chemotherapy-Induced Nausea and Vomiting: A Narrative Review. Oncol Nurs Forum [Internet]. 2016;43(3):389–93. Recuperado de: http://onf.ons.org/onf/43/3/genetic-influence-chemotherapy-induced-nausea-and-vomiting-narrative-review

16. Davoodi S, Mohammadzadeh Z, Safdari R. Mobile Phone Based System Opportunities to Home-based Managing of Chemotherapy Side Effects. Acta Inform medica AIM J Soc Med Informatics Bosnia Herzegovina časopis Društva za Med Inform BiH [Internet]. 2016;24(3):193–6. Recuperado de: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27482134\nhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4949047

17. Kim SY. Cancer metabolism: Strategic diversion from targeting cancer drivers to targeting cancer suppliers. Biomol Ther. 2015;23(2):99–109.

18. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. Cell [Internet]. Elsevier Inc.; 2011;144(5):646–74. Recuperado de: http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013

19. di Lonardo A, Nasi S, Pulciani S. Cancer: We should not forget the past. J Cancer. 2015;6(1):29–39.

20. Harrington KJ. Biology of cancer. Medicine (Baltimore) [Internet]. Elsevier Ltd; 2011;39(12):689–92. Recuperado de: http://dx.doi.org/10.1016/j.mpmed.2011.09.015

21. Laubenbacher R, Hower V, Jarrah A, Torti S V., Shulaev V, Mendes P, et al., A systems biology view of cancer. Biochim Biophys Acta - Rev Cancer [Internet]. Elsevier B.V.; 2009;1796(2):129–39. Recuperado de: http://dx.doi.org/10.1016/j.bbcan.2009.06.001

22. Rieger PT. The biology of cancer genetics. Semin Oncol Nurs. 2004;20(3):145–54.

23. Sullivan LB, Gui DY, Heiden MG Vander. Altered metabolite levels in cancer: implications for tumour biology and cancer therapy. Nat Rev Cancer [Internet]. Nature Publishing Group; 2016; Recuperado de: http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrc.2016.85

24. Weber CE, Kuo PC. The tumor microenvironment. Surg Oncol [Internet]. Elsevier Ltd; 2012;21(3):172–7. Recuperado de: http://dx.doi.org/10.1016/j.suronc.2011.09.001

25. Marks DL, Olson RLO, Fernandez-Zapico ME. Epigenetic control of the tumor microenvironment. Epigenomics. 2016;

26. Northcott JM, Northey JJ, Barnes JM, Weaver VM, Francisco S, Regeneration T, et al., Fighting the force: potential of homeobox genes for tumor

microenvironment regulation. Biochim Biophys Acta. 2016;1855(2):248–53.

27. Choi Y, Kim JW, Nam KH, Han S-H, Kim J-W, Ahn S-H, et al., Systemic inflammation is associated with the density of immune cells in the tumor microenvironment of gastric cancer. Gastric Cancer [Internet]. Springer Japan; 2016; Recuperado de: http://link.springer.com/10.1007/s10120-016-0642-0

28. velaei K, Samadi N, Barazvan B, Soleimani Rad J. Tumor microenvironment-mediated chemoresistance in breast cancer. The Breast [Internet]. Elsevier Ltd; 2016;30:92–100. Recuperado de: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960977616301631

29. De Milito A, Fais S. Tumor acidity, chemoresistance and proton pump inhibitors. Futur Oncol [Internet]. 2005;1(6):779–86. Recuperado de: http://www.futuremedicine.com/doi/abs/10.2217/14796694.1.6.779

30. Taylor S, Spugnini EP, Assaraf YG, Azzarito T, Rauch C, Fais S. Microenvironment acidity as a major determinant of tumor chemoresistance: Proton pump inhibitors (PPIs) as a novel therapeutic approach. Drug Resist Updat [Internet]. Elsevier Ltd; 2015;23:69–78. Recuperado de: http://dx.doi.org/10.1016/j.drup.2015.08.004

31. Floor SL, Dumont JE, Maenhaut C, Raspe E. Hallmarks of cancer: Of all cancer cells, all the time? Trends Mol Med. 2012;18(9):509–15.

32. Sancho P, Barneda D, Heeschen C. Hallmarks of cancer stem cell metabolism. Br J Cancer [Internet]. Nature Publishing Group; 2016;114(12):1305–12. Recuperado de: http://www.nature.com/doifinder/10.1038/bjc.2016.152

33. Hornsveld M, Dansen TB. The hallmarks of cancer from a redox perspective. Antioxidants Redox Signal. 2015;6:1–78.

34. Pavlova NN, Thompson CB. The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. Cell Metab [Internet]. Elsevier Inc.; 2016;23(1):27–47. Recuperado de: http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2015.12.006

35. Justus CR, Sanderlin EJ, Yang L V. Molecular connections between cancer cell metabolism and the tumor microenvironment. Int J Mol Sci. 2015;16(5):11055–86.

36. Morales DR, Morris AD. Metformin in Cancer Treatment and Prevention. Annu Rev Med [Internet]. 2014;(August 2014):1–13. Recuperado de: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25386929

37. Lu J, Tan M, Cai Q. The Warburg effect in tumor progression: Mitochondrial oxidative metabolism as an anti-metastasis mechanism. Cancer Lett [Internet]. Elsevier Ireland Ltd; 2015;356(2):156–64. Recuperado de: http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2014.04.001

38. Wallace DC. Mitochondria and cancer: Warburg addressed. Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 2005;70:363–74.

39. de Saedeleer CJ, Copetti T, Porporato PE, Verrax J, Feron O, Sonveaux P. Lactate Activates HIF-1 in Oxidative but Not in Warburg-Phenotype Human Tumor Cells. PLoS One. 2012;7(10).

40. Liberti M V., Locasale JW. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? Trends Biochem Sci [Internet]. Elsevier Ltd; 2016;41(3):211–8. Recuperado de: http://dx.doi.org/10.1016/j.tibs.2015.12.001

41. Wei H, Guo L, Li L, Zhou Q, Wu Z. Mechanism of warburg effect and its effect on tumor metastasis. Zhongguo Fei Ai Za Zhi. 2015;18(3):179–83.

42. Thornton SN. Lactate-Induced Cancer Anorexia. J Pain Symptom Manage. 2009;37(6):2008–9.

43. Rothschild SI, Thommen DS, Moersig W, Müllerb P, Zippelius A. Cancer immunology - Development of novel anti-cancer therapies. Swiss Med Wkly. 2015;145(February):1–10.

44. Vaughan R a, Gannon NP, Garcia-Smith R, Licon-Munoz Y, Barberena M a, Bisoffi M, et al., β-Alanine Suppresses Malignant Breast Epithelial Cell Aggressiveness Through Alterations in Metabolism and Cellular Acidity in Vitro. Mol Cancer [Internet]. 2014;13:14. Recuperado de: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3937146&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

45. Ngo H, Tortorella SM, Ververis K, Karagiannis TC. The Warburg effect: molecular aspects and therapeutic possibilities. Mol Biol Rep. 2015;42(4):825–34.

46. Ramos EJB, Suzuki S, Marks D, Inui A, Asakawa A, Meguid MM. Cancer anorexia-cachexia syndrome: cytokines and neuropeptides. Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 2004;7(4):427–34.

47. de Matos-Neto EM, Lima JDCC, de Pereira WO, Figuerêdo RG, Riccardi DM dos R, Radloff K, et al., Systemic inflammation in cachexia - Is tumor cytokine expression profile the culprit? Front Immunol. 2015;6(DEC):1–11.

48. Sordillo PP, Sordillo LA, Helson L. Bifunctional role of pro-inflammatory cytokines after traumatic brain injury. Brain Inj [Internet]. 2016;9052(June):1–11. Recuperado de: http://dx.doi.org/10.3109/02699052.2016.1163618

49. Lippitz BE. Cytokine patterns in patients with cancer: A systematic review. Lancet Oncol [Internet]. Elsevier Ltd; 2013;14(6):218–28. Recuperado de: http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(12)70582-X

50. Bye A, Wesseltoft-Rao N, Iversen PO, Skjegstad G, Holven KB, Ulven S, et al., Alterations in inflammatory biomarkers and energy intake in cancer cachexia: a prospective study in patients with inoperable pancreatic cancer. Med Oncol [Internet]. Springer US; 2016;33(6):1–9. Recuperado de: "http://dx.doi.org/10.1007/s12032-016-0768-2

51. Camargo R, Riccardi D, Ribeiro H, Carnevali L, de Matos-Neto E, Enjiu L, et al., NF-κBp65 and Expression of Its Pro-Inflammatory Target Genes Are Upregulated in the Subcutaneous Adipose Tissue of Cachectic Cancer Patients. Nutrients [Internet]. 2015;7(6):4465–79. Recuperado de: http://www.mdpi.com/2072-6643/7/6/4465/

52. Singhal V, Misra M, Klibanski A. Endocrinology of anorexia nervosa in young people: recent insights. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes. 2014;29(6):997–

1003.

53. Tarricone R, Ricca G, Nyanzi-Wakholi B, Medina-Lara A. Impact of cancer anorexia-cachexia syndrome on health-related quality of life and resource utilisation: A systematic review. Crit Rev Oncol Hematol [Internet]. Elsevier Ireland Ltd; 2016;99:49–62. Recuperado de: http://dx.doi.org/10.1016/j.critrevonc.2015.12.008

54. Molfino A, Gioia G, Fanelli FR, Laviano A. Contribution of Neuroinflammation to the Pathogenesis of Cancer Cachexia. Mediators Inflamm. Hindawi Publishing Corporation; 2015;2015.

55. Patra SK, Arora S. Integrative role of neuropeptides and cytokines in cancer anorexia-cachexia syndrome. Clin Chim Acta [Internet]. Elsevier B.V.; 2012;413(13–14):1025–34. Recuperado de: http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2011.12.008

56. Laviano A, Inui A, Marks DL, Meguid MM, Pichard C, Rossi Fanelli F, et al., Neural control of the anorexia-cachexia syndrome. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2008;295(5):E1000–8.

57. Singhal G, Jaehne EJ, Corrigan F, Toben C, Baune BT. Inflammasomes in neuroinflammation and changes in brain function: A focused review. Front Neurosci. 2014;8(SEP):1–22.

58. Narsale AA, Carson JA. Role of interleukin-6 in cachexia: therapeutic implications. Curr Opin Support Palliat Care [Internet]. 2014;8(4):321–7. Recuperado de: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4323347&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

59. Stenvinkel P, Ketteler M, Johnson RJ, Lindholm B, Pecoits-Filho R, Riella M, et al., IL-10, IL-6, and TNF-α: Central factors in the altered cytokine network of uremia - The good, the bad, and the ugly. Kidney Int. 2005;67(4):1216–33.

60. Ezeoke CC, Morley JE. Pathophysiology of anorexia in the cancer cachexia syndrome. J Cachexia Sarcopenia Muscle. 2015;6(4):287–302.

61. Roxburgh CSD, McMillan DC. Cancer and systemic inflammation: treat the tumour and treat the host. Br J Cancer [Internet]. Nature Publishing Group; 2014;110(6):1409–12. Recuperado de: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3960633&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

62. Trinchieri G. Cancer and inflammation: an old intuition with rapidly evolving new concepts. Annu Rev Immunol [Internet]. 2012;30(December):677–706. Recuperado de: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22224761

63. Tsoli M, Robertson G. Cancer cachexia: Malignant inflammation, tumorkines, and metabolic mayhem. Trends Endocrinol Metab [Internet]. Elsevier Ltd; 2013;24(4):174–83. Recuperado de: http://dx.doi.org/10.1016/j.tem.2012.10.006

64. Seelaender M, Batista M, Lira F, Silverio R, Rossi-Fanelli F. Inflammation in cancer cachexia: To resolve or not to resolve (is that the question?). Clin Nutr

[Internet]. Elsevier Ltd; 2012;31(4):562–6. Recuperado de: http://dx.doi.org/10.1016/j.clnu.2012.01.011

65. Mondello P, Mian M, Aloisi C, Famà F, Mondello S, Pitini V. Cancer Cachexia Syndrome: Pathogenesis, Diagnosis, and New Therapeutic Options. Nutr Cancer [Internet]. 2015;67(1):12–26. Recuperado de: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25513730\nhttp://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/01635581.2015.976318

66. Camacho L, Dasgupta A, Jiralerspong S. Metformin in breast cancer - an evolving mystery. Breast Cancer Res [Internet]. Breast Cancer Research; 2015;17(1):88. Recuperado de: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4480505&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

67. Silvério R, Laviano A, Fanelli FR, Seelaender M. L-carnitine and cancer cachexia: Clinical and experimental aspects. J Cachexia Sarcopenia Muscle. 2011;2(1):37–44.

68. Krasnow SM, Marks DL. Neuropeptides in the pathophysiology and treatment of cachexia. Curr Opin Support Palliat Care. 2010;4(4):266–71.

69. Nakhate KT, Kokare DM, Singru PS, Taksande AG, Kotwal SD, Subhedar NK. Hypothalamic cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide is reduced and fails to modulate feeding behavior in rats with chemically-induced mammary carcinogenesis. Pharmacol Biochem Behav [Internet]. Elsevier Inc.; 2010;97(2):340–9. Recuperado de: http://dx.doi.org/10.1016/j.pbb.2010.09.001

70. Grossberg AJ, Scarlett JM, Marks DL. Hypothalamic mechanisms in cachexia. Physiol Behav [Internet]. Elsevier Inc.; 2010;100(5):478–89. Recuperado de: http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2010.03.011

71. Laviano A, Seelaender M, Rianda S, Silverio R, Rossi Fanelli F. Neuroinflammation: a contributing factor to the pathogenesis of cancer cachexia. Crit Rev Oncog [Internet]. 2012;17(3):247–51. Recuperado de: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22831155

72. Beales ILP, Garcia-Morales C, Ogunwobi OO, Mutungi G. Adiponectin inhibits leptin-induced oncogenic signalling in oesophageal cancer cells by activation of PTP1B. Mol Cell Endocrinol [Internet]. Elsevier Ireland Ltd; 2014;382(1):150–8. Recuperado de: http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2013.08.013

73. Berglund ED, Vianna CR, Donato J, Kim MH, Chuang JC, Lee CE, et al., Direct leptin action on POMC neurons regulates glucose homeostasis and hepatic insulin sensitivity in mice. J Clin Invest. 2012;122(3):1000–9.

74. Zhang Z, Wang F, Wang B -j., Chu G, Cao Q, Sun B-G, et al., Inhibition of leptin-induced vascular extracellular matrix remodelling by adiponectin. J Mol Endocrinol [Internet]. 2014;53(2):145–54. Recuperado de: http://jme.endocrinology-journals.org/cgi/doi/10.1530/JME-14-0027

75. Crespo CS, Cachero AP, Jiménez LP, Barrios V, Ferreiro EA. Peptides and food intake. Front Endocrinol (Lausanne). 2014;5(APR):1–13.

76. Balland E, Cowley MA. New insights in leptin resistance mechanisms in mice.

Front Neuroendocrinol [Internet]. Elsevier Inc.; 2015;39(September):59–65. Recuperado de: http://dx.doi.org/10.1016/j.yfrne.2015.09.004

77. Suzuki M, Narita M, Ashikawa M, Furuta S, Matoba M, Sasaki H, et al., Changes in the melanocortin receptors in the hypothalamus of a rat model of cancer cachexia. Synapse. 2012;66(8):747–51.

78. Poleni PE, Akieda-Asai S, Koda S, Sakurai M, Bae CR, Senba K, et al., Possible involvement of melanocortin-4-receptor and AMP-activated protein kinase in the interaction of glucagon-like peptide-1 and leptin on feeding in rats. Biochem Biophys Res Commun [Internet]. Elsevier Inc.; 2012;420(1):36–41. Recuperado de: http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.02.109

79. Laviano A, Inui A, Meguid MM, Molfino A, Conte C, Rossi Fanelli F. NPY and brain monoamines in the pathogenesis of cancer anorexia. Nutrition. 2008;24(9):802–5.

80. García-Cáceres C, Yi CX, Tschöp MH. Hypothalamic Astrocytes in Obesity. Endocrinol Metab Clin North Am [Internet]. Elsevier Inc; 2013;42(1):57–66. Recuperado de: http://dx.doi.org/10.1016/j.ecl.2012.11.003

81. Dwarkasing J., Marks DL, Witkamp R., van Norren K. Hypothalamic inflammation and food intake regulation during chronic illness. Peptides [Internet]. Elsevier Inc.; 2015; Recuperado de: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0196978115001941

82. Pralong FP. Insulin and NPY pathways and the control of GnRH function and puberty onset. Mol Cell Endocrinol. 2010;324(1–2):82–6.

83. Cho K, Chung JY, Cho SK, Shin H-W, Jang I-J, Park J-W, et al., Antihyperglycemic mechanism of metformin occurs via the AMPK/LXRα/POMC pathway. Sci Rep [Internet]. 2015;5:8145. Recuperado de: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4311245&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

84. Idris A, Ghazali NB, Koh D. Interleukin 1β-A Potential Salivary Biomarker for Cancer Progression? Biomark Cancer [Internet]. 2015;7(7):25–9. Recuperado de: http://www.la-press.com/interleukin-1a-potential-salivary-biomarker-for-cancer-progression-article-a4935-abstract?article_id=4935

85. Monteleone M, Stow JL, Schroder K. Mechanisms of unconventional secretion of IL-1 family cytokines. Cytokine [Internet]. Elsevier Ltd; 2015;74(2):213–8. Recuperado de: http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2015.03.022

86. Guijarro A, Laviano A, Meguid MM. Chapter 22: Hypothalamic integration of immune function and metabolism. Progress in Brain Research. 2006. 367-405 p.

87. Dudás J, Fullár A, Bitsche M, Schartinger V, Kovalszky I, Sprinzl GM, et al., Tumor-produced, active Interleukin-1 β regulates gene expression in carcinoma-associated fibroblasts. Exp Cell Res [Internet]. Elsevier Inc.; 2011;317(15):2222–9. Recuperado de: http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2011.05.023

88. Pimentel GD, Ganeshan K, Carvalheira JBC. Hypothalamic inflammation and

the central nervous system control of energy homeostasis. Mol Cell Endocrinol [Internet]. Elsevier Ireland Ltd; 2014; Recuperado de: http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2014.06.005

89. Drougard A, Fournel A, Valet P, Knauf C. Impact of hypothalamic reactive oxygen species in the regulation of energy metabolism and food intake. Front Neurosci [Internet]. 2015;9(February):1–12. Recuperado de: http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fnins.2015.00056/abstract

90. Fox P, Hudson M, Brown C, Lord S, Gebski V, De Souza P, et al., Markers of systemic inflammation predict survival in patients with advanced renal cell cancer. Br J Cancer [Internet]. Nature Publishing Group; 2013;109(1):147–53. Recuperado de: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3708579&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

91. Xu B, Li H. Brain mechanisms of sympathetic activation in heart failure: Roles of the renin- angiotensin system, nitric oxide and pro- inflammatory cytokines (Review). Mol Med Rep [Internet]. 2015;12(6):7823–9. Recuperado de: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26499491

92. Aubert G, Mansuy V, Voirol MJ, Pellerin L, Pralong FP. The anorexigenic effects of metformin involve increases in hypothalamic leptin receptor expression. Metabolism [Internet]. Elsevier B.V.; 2011;60(3):327–34. Recuperado de: http://dx.doi.org/10.1016/j.metabol.2010.02.007

93. Burfeind KG, Michaelis KA, Marks DL. The central role of hypothalamic inflammation in the acute illness response and cachexia. Semin Cell Dev Biol [Internet]. Elsevier Ltd; 2016;54:42–52. Recuperado de: http://dx.doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.10.038

94. Foretz M, Taleux N, Guigas B, Horman S, Beauloye C, Andreelli F, et al., Regulation of energy metabolism by AMPK: a novel therapeutic approach for the treatment of metabolic and cardiovascular diseases. Med Sci (Paris) [Internet]. 2006;22(4):381–8. Recuperado de: http://www.medecinesciences.org/articles/medsci/full_html/2006/05/medsci2006224p381/medsci2006224p381.html

95. Kinaan M, Ding H, Triggle CR. Metformin: An Old Drug for the Treatment of Diabetes but a New Drug for the Protection of the Endothelium. Med Princ Pract. 2015;24(5):401–15.

96. Pernicova I, Korbonits M. Metformin—mode of action and clinical implications for diabetes and cancer. Nat Rev Endocrinol [Internet]. Nature Publishing Group; 2014;10(3):143–56. Recuperado de: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24393785\nhttp://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrendo.2013.256

97. Dallaglio K, Bruno A, Cantelmo AR, Esposito AI, Ruggiero L, Orecchioni S, et al., Paradoxic effects of metformin on endothelial cells and angiogenesis. Carcinogenesis. 2014;35(5):1055–66.

98. Bridges HR, Jones AJY, Pollak MN, Hirst J, Shaw RJ, Lamia KA, et al., Effects of metformin and other biguanides on oxidative phosphorylation in mitochondria.

Biochem J [Internet]. 2014;462(3):475–87. Recuperado de: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25017630\nhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4148174

99. Viollet B, Guigas B, Garcia NS, Leclerc J, Viollet B, Guigas B, et al., Cellular and molecular mechanisms of metformin : an overview . To cite this version : 2012;

100. Song R. Mechanism of metformin: A tale of two sites. Diabetes Care. 2016;39(2):187–9.

101. An H, He L. Current understanding of metformin effect on the control of hyperglycemia in diabetes. J Endocrinol. 2016;228(3):R97–106.

102. Hur KY, Lee MS. New mechanisms of metformin action: Focusing on mitochondria and the gut. J Diabetes Investig. 2015;6(6):600–9.

103. Scarpello JHB, Howlett HCS. Metformin therapy and clinical uses. Diab Vasc Dis Res. 2008;5(3):157–67.

104. Rena G, Pearson ER, Sakamoto K. Molecular mechanism of action of metformin: Old or new insights? Diabetologia. 2013;56(9):1898–906.

105. Sui X, Xu Y, Wang X, Han W, Pan H, Xiao M. Metformin: A Novel but Controversial Drug in Cancer Prevention and Treatment. Mol Pharm. 2015;12(11):3783–91.

106. Kasznicki J, Sliwinska A, Drzewoski J. Metformin in cancer prevention and therapy. Ann Transl Med [Internet]. 2014;2(6):57. Recuperado de: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4200668&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

107. Giovannucci E, Harlan DM, Archer MC, Bergenstal RM. Diabetes and Cancer : A Consensus Report. a Cancer J Clin. 2010;60(4):207–21.

108. Andrzejewski S, Gravel S-P, Pollak M, St-Pierre J. Metformin directly acts on mitochondria to alter cellular bioenergetics. Cancer Metab [Internet]. 2014;2(1):12. Recuperado de: http://www.cancerandmetabolism.com/content/2/1/12

109. Wang J, Gao Q, Wang D, Wang Z, Hu C. Metformin inhibits growth of lung adenocarcinoma cells by inducing apoptosis via the mitochondria-mediated pathway. Oncol Lett [Internet]. 2015;10(3):1343–9. Recuperado de: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4533709&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

110. Hadad SM, Coates P, Jordan LB, Dowling RJO, Chang MC, Done SJ, et al., Evidence for biological effects of metformin in operable breast cancer: biomarker analysis in a pre-operative window of opportunity randomized trial. Breast Cancer Res Treat. 2015;150(1):149–55.

111. Hirsch HA, Iliopoulos D, Struhl K. Metformin inhibits the inflammatory response associated with cellular transformation and cancer stem cell growth. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. 2013;110(3):972–7. Recuperado de: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3549132&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

112. Abdelsatir AA, Husain NE, Hassan AT, Elmadhoun WM, Almobarak AO, Ahmed MH. Potential benefit of metformin as treatment for colon cancer: The evidence so far. Asian Pacific J Cancer Prev. 2016;16(18):8053–8.

113. Pollak MN. Investigating metformin for cancer prevention and treatment: The end of the beginning. Cancer Discov. 2012;2(9):778–90.

114. Mitsuhashi A, Kiyokawa T, Sato Y, Shozu M. Effects of metformin on endometrial cancer cell growth in vivo: a preoperative prospective trial. Cancer. 2014;120(19):2986–95.

115. Ersoy C, Kiyici S, Budak F, Oral B, Guclu M, Duran C, et al., The effect of metformin treatment on VEGF and PAI-1 levels in obese type 2 diabetic patients. Diabetes Res Clin Pract. 2008;81(1):56–60.

116. Soraya H, Esfahanian N, Shakiba Y, Ghazi-Khansari M, Nikbin B, Hafezzadeh H, et al., Anti-angiogenic Effects of Metformin, an AMPK Activator, on Human Umbilical Vein Endothelial Cells and on Granulation Tissue in Rat. Iran J Basic Med Sci [Internet]. 2012;15(6):1202–9. Recuperado de: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23653852

117. Asensio-López MC, Lax A, Pascual-Figal DA, Valdés M, Sánchez-Más J. Metformin protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity: Involvement of the adiponectin cardiac system. Free Radic Biol Med [Internet]. Elsevier Inc.; 2011;51(10):1861–71. Recuperado de: http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.08.015

118. Defronzo R, Fleming GA, Chen K, Bicsak TA. Metformin-associated lactic acidosis: Current perspectives on causes and risk. Metabolism [Internet]. The Authors; 2016;65(2):20–9. Recuperado de: http://dx.doi.org/10.1016/j.metabol.2015.10.014

119. Foretz M, Guigas B, Bertrand L, Pollak M, Viollet B. Metformin: From mechanisms of action to therapies. Cell Metab [Internet]. Elsevier Inc.; 2014;20(6):953–66. Recuperado de: http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2014.09.018

120. Huang W, Castelino RL, Peterson GM. Adverse event notifications implicating metformin with lactic acidosis in Australia. J Diabetes Complications [Internet]. Elsevier Inc.; 2015;29(8):1261–5. Recuperado de: http://dx.doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2015.06.001

121. Bruijstens LA, van Luin M, Buscher-Jungerhans PMM, Bosch FH. Reality of severe metformin-induced lactic acidosis in the absence of chronic renal impairment. Neth J Med. 2008;66(5):185–90.

122. Keller G, Cour M, Hernu R, Illinger J, Robert D, Argaud L. Management of metformin-associated lactic acidosis by continuous renal replacement therapy. PLoS One. 2011;6(8).

123. Eppenga WL, Lalmohamed A, Geerts AF, Derijks HJ, Wensing M, Egberts A, et al., Risk of lactic acidosis or elevated lactate concentrations in metformin users with renal impairment: A population-based cohort study. Diabetes Care. 2014;37(8):2218–24.

124. Stevanovic D, Janjetovic K, Misirkic M, Vucicevic L, Sumarac-Dumanovic M, Micic D, et al., Intracerebroventricular administration of metformin inhibits ghrelin-induced hypothalamic AMP-kinase signalling and food intake. Neuroendocrinology. 2012;96(1):24–31.

125. Kim MJ, Han JY, Shin JY, Kim S Il, Lee JM, Hong S, et al., Metformin-associated lactic acidosis: predisposing factors and outcome. Endocrinol Metab (Seoul, Korea) [Internet]. 2015;30(1):78–83. Recuperado de: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4384670&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

126. Minokoshi Y, Shiuchi T, Lee S, Suzuki A, Okamoto S. Role of hypothalamic AMP-kinase in food intake regulation. Nutrition. 2008;24(9):786–90.

127. De Morentin PBM, González CR, Saha AK, Martins L, Diéguez C, Vidal-Puig A, et al., Hypothalamic AMP-activated protein kinase as a mediator of whole body energy balance. Rev Endocr Metab Disord. 2011;12(3):127–40.

128. Chau-Van C, Gamba M, Salvi R, Gaillard RC, Pralong FP. Metformin inhibits adenosine 5′-monophosphate-activated kinase activation and prevents increases in neuropeptide Y expression in cultured hypothalamic neurons. Endocrinology. 2007;148(2):507–11.

129. Adeyemo MA, McDuffie JR, Kozlosky M, Krakoff J, Calis KA, Brady SM, et al., Effects of Metformin on Energy Intake and Satiety in Obese Children. Diabetes Obes Metab. 2015;17(4):363–70.

130. Saisho Y. Metformin and Inflammation : Its Potential Beyond Glucose-lowering Effect. 2015;1–10.

131. Almaleki N, Ashraf M, Hussein MM, Mohiuddin SA. of Kidney Diseases and Transplantation Case Report Metformin-Associated Lactic Acidosis in a Peritoneal Dialysis Patient. 2015;26(2):325–8.

132. Bellinger PM, Minahan CL. The effect of *β* -alanine supplementation on cycling time trials of different length. Eur J Sport Sci [Internet]. Taylor & Francis; 2015;1391(January):1–8. Recuperado de: http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/17461391.2015.1120782

133. Bex T, Chung W, Baguet a, Stegen S, Stautemas J, Achten E, et al., Muscle carnosine loading by beta-alanine supplementation is more pronounced in trained vs. untrained muscles. J Appl Physiol [Internet]. 2014;116(2):204–9. Recuperado de: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24285150

134. Kratz C de A, De Salles Painelli V, Nemezio KM de A, Da Silva RP, Franchini E, Zagatto AM, et al., Beta-alanine supplementation enhances judo-related performance in highly-trained athletes. J Sci Med Sport [Internet]. Sports Medicine Australia; 2016;in press. Recuperado de: http://dx.doi.org/10.1016/j.jsams.2016.08.014

135. Hall JE, Granger JP, Hall ME. Physiology and Pathophysiology of Carnosine. Seldin and Geibisch's The Kidney. 2013;1:1319–52.

136. Son DO, Satsu H, Kiso Y, Totsuka M, Shimizu M. Inhibitory effect of carnosine on interleukin-8 production in intestinal epithelial cells through translational

regulation. Cytokine. 2008;42(2):265–76.

137. Hipkiss AR, Gaunitz F. Inhibition of tumour cell growth by carnosine: Some possible mechanisms. Amino Acids. 2014;46(2):327–37.

138. Stegen S, Bex T, Vervaet C, Vanhee L, Achten E, Derave W. Beta-Alanine dose for maintaining moderately elevated muscle carnosine levels. Med Sci Sports Exerc. 2014;46(7):1426–32.

139. Derave W, Ozdemir MS, Harris RC, Pottier A, Reyngoudt H, Koppo K, et al., beta-Alanine supplementation augments muscle carnosine content and attenuates fatigue during repeated isokinetic contraction bouts in trained sprinters. J Appl Physiol. 2007;103(5):1736–43.

140. Sale C, Hill C a, Ponte J, Harris RC. β-Alanine Supplementation Improves Isometric Endurance of the Knee Extensor Muscles. J Int Soc Sports Nutr [Internet]. ???; 2012;9(1):26. Recuperado de: ???

141. Solis MY, Cooper S, Hobson RM, Artioli GG, Otaduy MC, Roschel H, et al., Effects of beta-alanine supplementation on brain homocarnosine/carnosine signal and cognitive function: An exploratory study. PLoS One. 2015;10(4):1–16.

142. Del Favero S, Roschel H, Solis MY, Hayashi AP, Artioli GG, Otaduy MC, et al., Beta-alanine (Carnosyn^{TM}) supplementation in elderly subjects (60-80 years): Effects on muscle carnosine content and physical capacity. Amino Acids. 2012;43(1):49–56.

143. Blancquaert L, Everaert I, Derave W. β-alanine supplementation, muscle carnosine and exercise performance. Curr Opin Clin Nutr Metab Care [Internet]. 2015;18(1):63–70. Recuperado de: https://www.researchgate.net/publication/269188056_Beta-alanine_supplementation_muscle_carnosine_and_exercise_performance

144. Everaert I, Stegen S, Vanheel B, Taes Y, Derave W. Effect of beta-alanine and carnosine supplementation on muscle contractility in mice. Med Sci Sports Exerc. 2013;45(1):43–51.

145. Glenn JM, Gray M, Stewart RW, Moyen NE, Kavouras SA, DiBrezzo R, et al., Effects of 28-day beta-alanine supplementation on isokinetic exercise performance and body composition in female masters athletes. J Strength Cond Res [Internet]. 2015;30(1):200–7. Recuperado de: http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00124278-900000000-96849

146. Budzen S, Rymaszewska J. The biological role of carnosine and its possible applications in medicine. Adv Clin Exp Med [Internet]. 2013;22(5):739–44. Recuperado de: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24285460

147. Naderi A, Hemat Far A, Willems ME, Sadeghi M. Effect of Four Weeks of β-alanine Supplementation on Muscle Carnosine and Blood Serum Lactate during Exercise in Male Rats. J Diet Suppl [Internet]. 2016;211(September):1–8. Recuperado de: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26745664

148. Janssen B, Hohenadel D, Brinkkoetter P, Peters V, Rind N, Fischer C, et al., Carnosine as a Protective Factor in Diabetic Nephropaty. Diabetes.

2005;54(August):2320–7.

149. Shen Y, Yang J, Li J, Shi X, Ouyang L, Tian Y, et al., Carnosine inhibits the proliferation of human gastric cancer SGC-7901 cells through both of the mitochondrial respiration and glycolysis pathways. PLoS One. 2014;9(8).

150. Jia H, Qi X, Fang S, Jin Y, Han X, Wang Y, et al., Carnosine inhibits high glucose-induced mesangial cell proliferation through mediating cell cycle progression. Regul Pept [Internet]. Elsevier B.V.; 2009;154(1–3):69–76. Recuperado de: http://dx.doi.org/10.1016/j.regpep.2008.12.004

151. Lombardi C, Metra M. Carnosine: Potential aid for diabetes and cardiovascular disease. Obesity [Internet]. 2016;24(5):989–989. Recuperado de: http://doi.wiley.com/10.1002/oby.21458

152. Fleisher-Berkovich S, Abramovitch-Dahan C, Ben-Shabat S, Apte R, Beit-Yannai E. Inhibitory effect of carnosine and N-acetyl carnosine on LPS-induced microglial oxidative stress and inflammation. Peptides. 2009;30(7):1306–12.

153. Tsai SJ, Kuo WW, Liu WH, Yin MC. Antioxidative and anti-inflammatory protection from carnosine in the striatum of MPTP-treated mice. J Agric Food Chem. 2010;58(21):11510–6.

154. Renner C, Zemitzsch N, Fuchs B, Geiger KD, Hermes M, Hengstler J, et al., Carnosine retards tumor growth in vivo in an NIH3T3-HER2/neu mouse model. Mol Cancer. 2010;9:2.

155. Renner C, Asperger A, Seyffarth A, Meixensberger J, Gebhardt R, Gaunitz F. Carnosine inhibits ATP production in cells from malignant glioma. Neurol Res. 2010;32(1):101–5.

156. Gaunitz F, Hipkiss AR. Carnosine and cancer: A perspective. Amino Acids. 2012;43(1):135–42.

157. Zhang Z, Miao L, Wu X, Liu G, Peng Y, Xin X, et al., Carnosine Inhibits the Proliferation of Human Gastric Carcinoma Cells by Retarding Akt/mTOR/p70S6K Signaling. J Cancer [Internet]. 2014;5(5):382–9. Recuperado de: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4007526&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

158. Baky NAA, Fadda L, Al-Rasheed NM, Mohamed A, Yacoub H. Neuroprotective effect of carnosine and cyclosporine-A against inflammation, apoptosis, and oxidative brain damage after closed head injury in immature rats. Toxicol Mech Methods [Internet]. Taylor & Francis; 2016;26(1):1–10. Recuperado de: http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed13&NEWS=N&AN=2015308904

159. Choi E, Carruthers K, Zhang L, Thomas N, Battaglino R a, Morse LR, et al., Concurrent muscle and bone deterioration in a murine model of cancer cachexia. Physiol Rep [Internet]. 2013;1(6):e00144. Recuperado de: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3871459&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

160. Puppa MJ, Gao S, Narsale A a., Carson J a. Skeletal muscle glycoprotein 130's

role in Lewis lung carcinoma-induced cachexia. FASEB J. 2014;28(2):998–1009.

161. Rouru J, Pesonen U, Koulu M, Huupponen R, Santti E, Virtanen K, et al., Anorectic effect of metformin in obese Zucker rats: lack of evidence for the involvement of neuropeptide Y. Eur J Pharmacol. 1995;273(1–2):99–106.

162. La LDE, Pereg M, Manuel V, Hierro G, Baños PÁ, Barrio JPI. Notas clínicas Acidosis láctica por metformina. 2007;54(6):2006–8.

163. Tébar MT, de Luis N, Sánchez I, Aguilera L. Acidosis láctica por metformina en la Unidad de Cuidados Intensivos. Rev Esp Anestesiol Reanim [Internet]. Sociedad Española de Anestesiología, Reanimación y Terapéutica del Dolor; 2014;61(8):466–7. Recuperado de: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0034935613003095

164. Duan Y, Zhang R, Zhang M, Sun LJ, Dong SZ, Wang G, et al., Metformin inhibits food intake and neuropeptide Y gene expression in the hypothalamus. Neural Regen Res [Internet]. 2013;8(25):2379–88. Recuperado de: http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84889822203&partnerID=40&md5=1ad29bdfe2f026a901ff70371c44223a

165. Lee CK, Choi YJ, Park SY, Kim JY, Won KC, Kim YW. Intracerebroventricular injection of metformin induces anorexia in rats. Diabetes Metab J. 2012;36(4):293–9.

166. Vecchio S, Giampreti A, Petrolini VM, Lonati D, Protti A, Papa P, et al., Metformin accumulation: lactic acidosis and high plasmatic metformin levels in a retrospective case series of 66 patients on chronic therapy. Clin Toxicol [Internet]. 2014;52(2):129–35. Recuperado de: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24283301

167. Harris RC, Sale C. β-Alanine Supplementation in High- Intensity Exercise. Acute Top Sport Nutr. 2013;59(November 2011):1–17.

168. Tobias G, Benatti FB, De Salles Painelli V, Roschel H, Gualano B, Sale C, et al., Additive effects of beta-alanine and sodium bicarbonate on upper-body intermittent performance. Amino Acids. 2013;45(2):309–17.

169. Gujar AD, Ibrahim B a, Tamrakar P, Cherian AK, Briski KP. Hindbrain lactostasis regulates hypothalamic AMPK activity and metabolic neurotransmitter mRNA and protein responses to hypoglycemia. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol [Internet]. 2014;306(7):R457-69. Recuperado de: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24381179

170. Lopaschuk GD, Ussher JR, Jaswal JS. Targeting intermediary metabolism in the hypothalamus as a mechanism to regulate appetite. Pharmacol Rev. 2010;62(2):237–64.

171. Cha SH, Lane MD. Central lactate metabolism suppresses food intake via the hypothalamic AMP kinase/malonyl-CoA signaling pathway. Biochem Biophys Res Commun [Internet]. Elsevier Inc.; 2009;386(1):212–6. Recuperado de: http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.06.017

172. Pierotti M a, Berrino F, Gariboldi M, Melani C, Mogavero a, Negri T, et al.,

Targeting metabolism for cancer treatment and prevention: metformin, an old drug with multi-faceted effects. Oncogene [Internet]. Nature Publishing Group; 2012;32(12):1475–87. Recuperado de: http://dx.doi.org/10.1038/onc.2012.181

173. Pandey A, Kumar VL. Protective Effect of Metformin against Acute Inflammation and Oxidative Stress in Rat. Drug Dev Res [Internet]. 2016;77(6):278–84. Recuperado de: http://doi.wiley.com/10.1002/ddr.21322

174. Helena W, Karolina A, Eduarda M, França R, Aline L, Bezerra D, et al., Effects of metformin on inflammation and short-term memory in streptozotocin-induced diabetic mice. Brain Res [Internet]. Elsevier; 2016;1644:149–60. Recuperado de: <Go to ISI>://WOS:000379105300017

175. Woo SL, Xu H, Li H, Zhao Y, Hu X, Zhao J, et al., Metformin ameliorates hepatic steatosis and inflammation without altering adipose phenotype in diet-induced obesity. PLoS One. 2014;9(3):1–10.

176. Voronov E, Carmi Y, Apte RN. The role IL-1 in tumor-mediated angiogenesis. Front Physiol. 2014;5 MAR(March):1–11.

177. Apte RN, Dotan S, Elkabets M, White MR, Reich E, Carmi Y, et al., The involvement of IL-1 in tumorigenesis, tumor invasiveness, metastasis and tumor-host interactions. Cancer Metastasis Rev. 2006;25(3):387–408.

178. Pal S, Yadav P, Sainis KB, Shankar BS. TNF-α and IGF-1 differentially modulate ionizing radiation responses of lung cancer cell lines. Cytokine [Internet]. 2016;1–10. Recuperado de: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1043466616301430

179. Gupta M, Babic A, Beck AH, Terry K. TNF-α expression, risk factors, and inflammatory exposures in ovarian cancer: Evidence for an inflammatory pathway of ovarian carcinogenesis? Hum Pathol [Internet]. Elsevier B.V.; 2016;54:82–91. Recuperado de: http://dx.doi.org/10.1016/j.humpath.2016.03.006

180. Romanatto T, Cesquini M, Amaral ME, Roman ÉA, Moraes JC, Torsoni MA, et al., TNF-α acts in the hypothalamus inhibiting food intake and increasing the respiratory quotient-Effects on leptin and insulin signaling pathways. Peptides. 2007;28(5):1050–8.

181. Flint TR, Janowitz T, Connell CM, Coll AP, Jodrell DI, Fearon DT, et al., Tumor-Induced IL-6 Reprograms Host Metabolism to Suppress Anti-tumor Immunity Article Tumor-Induced IL-6 Reprograms Host Metabolism to Suppress Anti-tumor Immunity. Cell Metab [Internet]. Elsevier Inc.; 2016;24(5):1–13. Recuperado de: http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2016.10.010

182. Miller S, Senior P V., Prakash M, Apostolopoulos V, Sakkal S, Nurgali K. Leukocyte populations and IL-6 in the tumor microenvironment of an orthotopic colorectal cancer model. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai). 2016;48(4):334–41.

183. Oft M. IL-10: master switch from tumor-promoting inflammation to antitumor immunity. Cancer Immunol Res [Internet]. 2014;2(3):194–9. Recuperado de: http://cancerimmunolres.aacrjournals.org/content/2/3/194.full

184. Mumm JB, Oft M. Pegylated IL-10 induces cancer immunity: The surprising role of IL-10 as a potent inducer of IFN-??-mediated CD8+ T cell cytotoxicity Prospects & Overviews. BioEssays. 2013;35(7):623–31.