

MARCELO KRYCZYK

**TREINAMENTO DE SALTO E NATAÇÃO ASSOCIADO À SUPLEMENTAÇÃO COM
ÓLEO DE FÍGADO DE TUBARÃO DIMINUE CRESCIMENTO TUMORAL E ATENUA
A INSTALAÇÃO DA SÍNDROME DA CAQUEXIA EM RATOS PORTADORES DO
TUMOR DE WALKER-256**

**CURITIBA
2008**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

MARCELO KRYCZYK

**TREINAMENTO DE SALTO E NATAÇÃO ASSOCIADO À SUPLEMENTAÇÃO COM
ÓLEO DE FÍGADO DE TUBARÃO DIMINUI CRESCIMENTO TUMORAL E ATENUA
A INSTALAÇÃO DA SÍNDROME DA CAQUEXIA EM RATOS PORTADORES DO
TUMOR DE WALKER-256**

Dissertação de mestrado, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Área de Concentração Fisiologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Cláudio Fernandes

**CURITIBA
2008**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela minha vida....

Aos meus Pais Augustinho e Josefa pelo apoio incondicional e por sempre acreditarem nos meus sonhos e proporcionarem condições para que eles se tornassem realidade. Meus irmãos Deize e Dionei e meus cunhados Ludmila e Antonio Carlos por todas as conversas e conselhos. A Helena por agitar e alegrar muito a casa e ao mais novo membro da família que está por chegar Vinicius.

Gostaria de fazer um agradecimento especial ao Prof. Luiz Cláudio. Chefe muito obrigado pela oportunidade de realizar esse trabalho e poder fazer parte dessa família chamada LabMetab. Me sinto privilegiado e orgulhoso por ser orientado por você.

Ao meu amigo Jaisson por toda a ajuda e tempo de convivência.... É Galo Véio, lembra de quando começamos.... as disciplinas, o trabalho a fazer, quantos ratos a treinar, quanta correria e louça para lavar durante os experimentos. É meu amigo, foi bem trabalhoso, mas também muito gratificante. Superamos todas as dificuldades e nosso trabalho está aí, muito obrigado por toda a ajuda e foi um prazer poder trabalhar com você.

Ao pessoal do lab. que eu sempre podia pedir socorro nos inúmeros momentos de dúvidas: Everson, Gleisson, Fabiola, Ricardo e Sandro, galera muito obrigado pela paciência e por toda a contribuição, valeu mesmo.

Aos meus amigos de laboratório: Ana, Andressa, Dani Pequito, Carina, Dalton e suas meninas (Tati, Carol e Bruna, valeu pela força nos treinos dos ratos), Diogo, Elo, Gina, Izabela, Juliano, Katya, Luciana, Luiz Alexandre, Loli, Paulo, Pedro, Richelli. Pessoal muito obrigado por toda a força nos experimentos e por todos os momentos de descontração juntos.

Ao Luizão do biotério pela ajuda com os ratos e por todos que, de alguma forma, participaram desse trabalho.

SUMÁRIO

	Pág.
LISTA DE ABREVIATURAS	iv
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	vi
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO	09
2. JUSTIFICATIVA	24
3. OBJETIVOS	25
4. MATERIAIS E MÉTODOS	26
5. RESULTADOS	34
6. DISCUSSÃO	43
7. CONCLUSÃO....	49
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	-	Ácido araquidônico
ALA	-	Ácido graxo α -linolênico
ACSM	-	Colégio Americano de Medicina e Esporte
Apaf-1	-	Fator de indução de proteases apoptóticas -1
AMP	-	Adenosina monofosfato
ATP	-	Adenosina trifosfato
COX	-	Cicloxygenase
CPM	-	Contagem por minuto
DHA	-	Ácido docosa-hexaenóico
DNA	-	Ácido Desoxirribonucleico
E1	-	Enzima ativadora de ubiquitina
E2	-	Enzima de conjugação de ubiquitina
E3	-	Proteína ligase de ubiquitina
EDL	-	Músculo <i>extensor digitorum longus</i>
EPA	-	Ácido eicosapentaenóico
EPM	-	Erro padrão da média
EX	-	Grupo exercitado
EXA	-	Grupo exercitado suplementado com óleo de fígado de tubarão
EXW	-	Grupo exercitado portador de tumor
EXWA	-	Grupo exercitado portador de tumor suplementado com óleo de fígado de tubarão
HSL	-	Lipase hormônio-sensível
IGF -1	-	Fator de crescimento parecido com a insulina - 1
IGFBP-1	-	Proteína ligante ao IGF-1
LA	-	Ácido graxo linoléico
LDh	-	Lactato desidrogenase
LOX	-	Lipoxigenase
LPL	-	Lípase lipoprotéica
MAF bx	-	<i>Muscle atrophy F box</i>
MURF 1	-	<i>Muscle RING finger 1</i>

NAD ⁺	- Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo
NADH	- Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-forma reduzida
NF-κB	- Fator de transcrição nuclear kappa B
PBS	- Tampão Fosfato-salina
PKA	- Proteína quinase A
PKC	- Proteína quinase C
Rpm	- Rotação por minuto
S	- Grupo sedentário
SDS-page	- Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
SA	- Grupo sedentário suplementado com óleo de fígado de tubarão
SW	- Grupo sedentário portador de tumor
SWA	- Grupo sedentário portador do tumor suplementado com óleo de fígado de tubarão
TCA	- Ácido tricloroacético
Ub	- Ubiquitina
VO ₂ máx	- Consumo máximo de oxigênio

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

TABELAS

TABELA 1: Peso dos indivíduos antes e 15 dias após a inoculação do tumor, peso dos tumores ao final de 15 dias e ganho de peso no mesmo período.....	38
---	----

FIGURAS

FIGURA 1: Via proteolítica da Ubiquitina Proteossomo. Adaptado de TISDALE, 2003.....	11
FIGURA 2: Perfil do consumo de gordura e ácidos graxos da espécie humana ao longo dos anos. Adaptado de SIMOPOULOS, 2002.....	17
FIGURA 3: Representação esquemática das diferentes famílias de ácidos graxos poliinsaturados. Adaptado de ROSE & CONNOLLY, 1999.....	18
FIGURA 4: Metabolismo de ácidos graxos n-3 e n-6. Adaptado de CALDER (1998).....	19
FIGURA 5: Estrutura química das moléculas de alquilglicerol mais comuns.....	20
FIGURA 6: Estrutura química do 1-O-(2-metóxi) hexadecilglicerol, encontrado no óleo de fígado de tubarão.....	21
FIGURA 7: Estrutura química da molécula de esqualamina.....	22
FIGURA 8: Glicemia (mg/dL).....	34
FIGURA 9: Lactatemia (mmol/L).....	35
FIGURA 10: Triacilglicerolemia (mg/dL).....	36
FIGURA 11: Peso do tumor (g).....	37
FIGURA 12: Proliferação de célula tumoral “ex vivo” (cpm).....	39
FIGURA 13: Produção de hidroperóxidos (nmol/mg proteína).....	40
FIGURA 14: Relação da expressão de Bax/Bcl-2 em tecido tumoral (unidades arbitrárias).....	41
FIGURA 15: Apoptose em células tumorais (número de eventos).....	42

RESUMO

Caquexia é um quadro de catabolismo intenso que ocorre simultaneamente ao crescimento tumoral, presente em até dois terços dos indivíduos com câncer terminal. Simples mudanças de hábitos, como alimentação saudável, não fumar e praticar atividades físicas regularmente, podem diminuir fatores de risco de desenvolvimento de doenças. Objetivo deste estudo foi investigar o efeito do exercício físico associado à suplementação com óleo de fígado de tubarão sobre a caquexia e vias de crescimento tumoral. Ratos foram distribuídos em oito grupos: Sedentário (S), Sedentário suplementado com óleo de fígado de tubarão (SA), Exercitado (EX), Exercitado suplementado com óleo de fígado de tubarão (EXA), Sedentário portador de tumor (SW), Sedentário portador de tumor suplementado com óleo de fígado de tubarão (SWA), Exercitado portador de tumor (EXW) e Exercitado portador de tumor suplementado com óleo de fígado de tubarão (EXWA). Os grupos exercitados realizaram um programa de treinamento, constituído de 6 séries de saltos com 1 minuto de intervalo, sobrecarga de 50% do seu peso corporal acoplada ao tórax, cinco minutos após o término do treinamento de saltos os mesmos grupos exercitados foram submetidos a 30 minutos de natação com uma carga equivalente a 6% do peso corpóreo. Foram realizadas 4 sessões semanais de treinamento durante 8 semanas. Na sexta semana de treinamento foram inoculadas 1 mL de células do tumor de Walker-256 (3×10^7 células) nos grupos SW, SWA, EXW e EXWA. Os ratos foram ortotansados 15 dias após a inoculação do tumor, sendo coletado sangue, tecidos e células. O grupo SW apresentou hipoglicemia ($68,67 \pm 2,12$ mg/dL), hiperlaticidemia ($1,489 \pm 0,061$ mmol/L), hipertriacilglicerolemia ($161,4 \pm 9,43$ mg/dL) e perda de peso ($23,01 \pm 1,47$ g) caracterizando quadro de caquexia. Os grupos SWA, EXW e EXWA atenuaram a instalação da caquexia quando comparados com o grupo SW. Os tumores dos grupos SWA, EXW e EXWA tiveram diminuição da proliferação celular, aumento da produção de hidroperóxidos e de apoptose. A relação da expressão de Bax/Bcl-2 aumentou somente nos grupos EXW e EXWA. Quando analisado o peso do tumor, proliferação de células tumorais e apoptose, observamos um efeito aditivo da associação do exercício físico com a suplementação com óleo de fígado de tubarão. Tanto a suplementação com óleo de fígado de tubarão, como o exercício físico e a associação das duas intervenções diminuem a instalação da caquexia e o crescimento tumoral.

Palavras-Chave: Exercício físico, câncer, caquexia, óleo de fígado de tubarão.

ABSTRACT

Cachexia is an intense catabolic state occurring simultaneously with tumor growth mainly in terminal cancer patient. Simple changes in habits such as healthy diet, not smoking and practicing regular physical activity may reduce risk factors for development of disease. Purpose of this study was to investigate the effect of physical activity associated with the supplementation shark liver oil on the cachexia and pathways tumor growth. Rats were randomized divided into 8 groups: sedentary (S), sedentary shark liver oil supplemented (SA), Exercised (EX), Exercised shark liver oil supplemented (EXA), sedentary tumor-bearing (SW), sedentary tumor-bearing shark liver oil supplemented (SWA), exercised tumor-bearing (EXW) and exercised tumor-bearing shark liver oil supplemented (EXWA). Training session consisted of 6 bouts, 30 seconds each with 50% body-weight load attached to the back followed by 1 minute of resting. Five minutes after the jump training the same exercise groups were subjected to 30 minute of swimming with a load equivalent to 6% of body weight, during 4 times a week during 8 weeks. A suspension of Walker 256 tumor cells (1mL of 3×10^7 cells/mL) was inject in the rats (tumor bearing) after 6 weeks of training. All individuals were killed 15 days post tumor inoculation and the blood and tumor tissue were harvested. The group SW showed hypoglycemia ($68,67 \pm 2,12$ mg/dL), hyperlactacidemia ($1,49 \pm 0,061$ mmol/L), hypertriacylglycerolemia ($161,4 \pm 9,4$ mg/dL) and weight reduction ($23,01 \pm 1,47$ g) characterizing cachexia state. The groups SWA, EXW and EXWA decreased the tumor cells proliferation, increased production of hydroperoxide and apoptosis. The ratio Bax/Bcl-2 increased only the groups EXW and EXWA. When we analyse the tumor weight, proliferation of tumor cells and apoptosis, we observed an additive effect of the association of exercise with supplementation with shark liver oil. The shark liver oil supplementation as exercise and the combination of the two interventions reduce the installation of cachexia and tumor growth.

Keywords: Physical exercise, cancer, cachexia, shark liver oil.

INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER E CAQUEXIA

Câncer é uma doença genética em que o fenótipo maligno resulta de alteração gênicas, transmitida da célula alterada para as células filhas. Anormalidades tanto nos genes estimuladores de divisão celular (oncogenes), como nos protetores ou bloqueadores do ciclo celular (genes supressores tumorais), podem conferir às células tumorais vantagens de crescimento e desenvolvimento sobre as células saudáveis (DUNLOP & CAMPBELL, 2000).

Comumente, o paciente com câncer pode sofrer de náuseas, depressão, diminuição da capacidade aeróbica, fadiga, diminuição da força muscular e flexibilidade, atrofia muscular e acentuada perda de massa muscular (COURNEYA; FRIEDENREICH, 1997). Estas podem ser manifestações relacionadas à síndrome da caquexia, que é caracterizada pela instalação de um quadro de catabolismo intenso simultaneamente ao crescimento tumoral, presente em até dois terços dos indivíduos que morrem de câncer (MACDONALD et al., 2003).

Os mecanismos utilizados pelo tumor para induzir a perda de tecido muscular não são totalmente esclarecidos. Evidências apontam para liberação de citocinas pró-inflamatórias e ativação de vias proteolíticas, dentro das células musculares que participam deste processo (TISDALE, 2000). A ativação destes fatores leva a alterações no metabolismo protéico muscular, acarretando em aumento da degradação e diminuição da síntese protéica, resultando em balanço nitrogenado negativo (AL-MAJID & MCCARTHY, 2001a). A caquexia por ser um processo catabólico profundo, observa-se que os estoques de proteínas, carboidratos e lipídios estão alterados (MACDONALD, 2003). No metabolismo de carboidratos, ocorre aumento da concentração de lactato circulante (acidemia láctica), modificações na tolerância à glicose, gliconeogênese hepática alterada e elevada atividade do ciclo de Cori. Um dos fatores relacionados a estes desequilíbrios é o alto consumo de glicose pela via anaeróbica e produção de lactato apresentada pela maioria dos tumores sólidos (ARGILÉS et al., 1997). Nessa condição catabólica ocorre a conversão de lactato em glicose no fígado por gliconeogênese, processo conhecido como ciclo de Cori (DUNLOP & CAMPBELL, 2000), o qual normalmente é

responsável por 20% do *turnover* da glicose. Em indivíduos com caquexia sua atividade está aumentada em até 50%, sendo responsável por 60% do lactato produzido. A conversão de glicose em lactato nas células tumorais produz duas moléculas de ATP, enquanto a conversão de lactato em glicose no fígado requer seis moléculas de ATP (TISDALE, 2005), gerando assim um gasto energético de aproximadamente 300 Kcal/dia para o indivíduo caquético (EDEN, 1984).

No metabolismo de proteínas, foi observado principalmente, acentuada proteólise muscular, permitindo o fornecimento de aminoácidos, principalmente alanina e glutamina para a produção de glicose no fígado e nos rins, respectivamente. Os aminoácidos liberados a partir da musculatura esquelética também podem ser utilizados pelo tumor como substrato energético (TISDALE, 2001). A degradação das proteínas intracelulares pode ser controlada por três vias: sistema lisossomal, sistema Ca^{++} dependente, e via proteolítica ATP-ubiquitina dependente. As três vias podem estar envolvidas na caquexia, mas o sistema ATP-ubiquitina dependente é a mais importante. O proteossomo não degrada miofibrilas intactas, a degradação de bandas-Z no músculo com subsequente perda de actina e miosina do sarcômero é mediada pela enzima Ca^{++} dependente calpaína (HASSELGREN et al., 2001). Os sistemas lisossomal e Ca^{++} dependentes contribuem com 15 a 20% do total de proteínas musculares degradadas, enquanto a via proteossomo ubiquitina é considerada a principal responsável pela perda muscular em humanos (WILLIAMS et al., 1999; BIOLO et al., 2000) e modelos animais com caquexia (LORITE et al., 1998). Nesse processo, as proteínas selecionadas para degradação são primeiramente associadas com uma pequena proteína, a ubiquitina, um sinal para degradação no proteossomo 26S, o qual é um grande complexo de multi-subunidades que requer ATP para seu funcionamento (FIGURA 1).

Existem pelo menos seis ATPases associadas com o proteossomo 26S que atuam constantemente, fornecendo energia para degradação de proteínas (TANAKA, 1998). Para que a proteína se ligue ao proteossomo é necessário que ela seja desdobrada e este processo requer energia. O proteossomo é uma estrutura tubular, constituída de uma pilha com quatro anéis, incluindo dois anéis- α exteriores e dois anéis- β interiores. A atividade proteolítica é observada nas β -subunidades no lado interno do proteossomo (ATTAIX et al., 1997). A ubiquitina é ativada e presa à

proteína por uma série de enzimas: E1, enzima ativadora de ubiquitina; E2, enzima de conjugação de ubiquitina; e E3, proteína ligase de ubiquitina. (FIGURA 1). A disponibilidade de proteínas para a ubiquitinação é dependente do equilíbrio entre a taxa de conjugação e a taxa de desubiquitinação (RAJAPUROHITAM et al., 2002). Somente proteínas selecionadas serão reconhecidas por E3s e direcionadas à degradação. Apesar disso, duas ubiquitinas ligases no músculo, MURF 1 (*muscle RING finger 1*) e MAF bx (*muscle atrophy F box*), estão elevadas no músculo esquelético em condições de degradação protéica aumentada, indicando ser uma limitação para a taxa de conjugação da ubiquitina (BODINE et al., 2001).

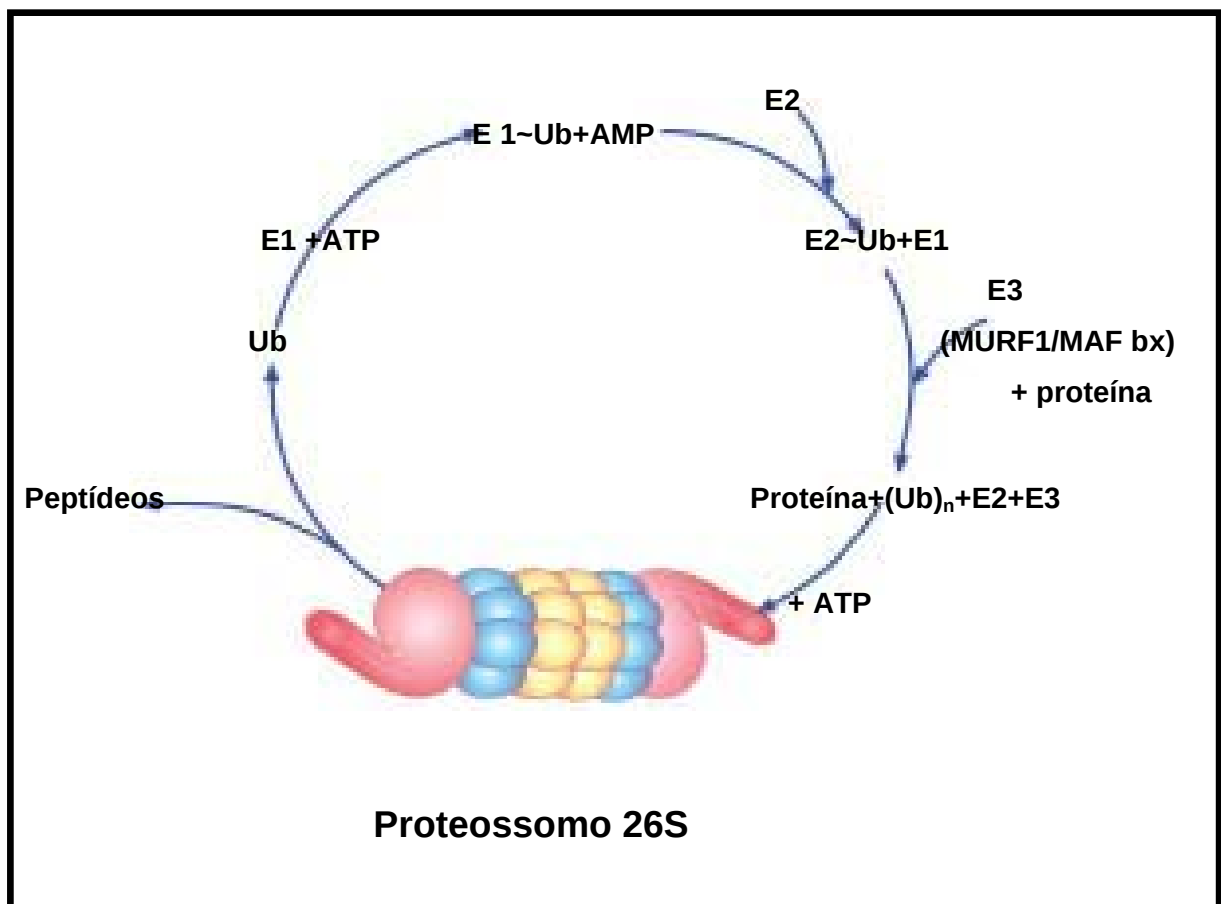


FIGURA 1: Via proteolítica da Ubiquitina Proteossomo. Adaptado TISDALE, 2003.

Abreviaturas: AMP = adenosina monofosfato; ATP = adenosina trifosfato; E1 = enzima ativadora de ubiquitina; E2 = enzima de conjugação de ubiquitina; E3 = proteína ligase de ubiquitina; MAF bx = *muscle atrophy F box*; MURF 1 = *muscle RING finger 1*; Ub = ubiquitina.

Finalmente, as mudanças no metabolismo de lipídios se caracterizam por hiperlipidemia, depleção de estoques de triacilglicerol (TISDALE, 2001) e alterações

no complexo carnitina palmitoil-CoA transferase (CPT), responsável pela utilização de ácidos graxos de cadeia longa no fígado e outros tecidos (SEELAENDER, 1994). Cerca de 85% do tecido adiposo pode ser perdido durante o processo de caquexia, seja pela lipólise aumentada ou diminuição da lipogênese (FEARON, 1992). A redução dos estoques de lipídios e a hiperlipidemia, observadas em pacientes portadores de tumor, podem ser resultantes do aumento da atividade lipolítica, liberando glicerol para a gliconeogênese hepática e ácidos graxos para serem utilizados como substrato alternativo à glicose pelos tecidos periféricos. Estas mudanças são basicamente devidas à queda na atividade da lipase lipoprotéica (LPL) e aumento na atividade da lipase hormônio sensível (HSL). Ocorre também inibição do transporte de glicose para os tecidos e redução na capacidade de síntese de novos ácidos graxos, devida a menor atividade de enzimas-chave da liponeogênese, como a acetil-CoA carboxilase (ARGILÉS et al., 2005). A diminuição da atividade da lipase lipoprotéica (LPL) acarreta em hipertriacilglicerolemia e compromete a absorção de lipídeos pelo tecido adiposo e muscular (NOGUCHI et al., 1996).

1.2 CÂNCER E ATIVIDADE FÍSICA

O interesse pela prática de atividade física como meio primário na prevenção do câncer e outras doenças vem aumentando gradativamente, em virtude dos efeitos protetores ocasionados pelo exercício físico. Simples mudanças de hábitos, como alimentação mais saudável, não fumar e praticar atividades físicas regularmente podem diminuir fatores de riscos (FREDENREICH & ORENSTEIN, 2002). O exercício físico demonstra ter efeitos positivos em doenças crônicas, incluindo, cardiopatias (TAYLOR et al., 2004), hipertensão arterial (PESCATELLO et al., 2004), obesidade (JAKICIC et al., 2001), diabetes (ALBRIGHT et al., 2000), doenças neuromusculares (VUORI, 2001) e câncer (STEVINSON, 2004). Entre os benefícios proporcionados pelo exercício, foi demonstrado o restabelecimento da função pulmonar, aumento da força muscular, e consequentemente, melhor mobilidade e autonomia. Pacientes com câncer que participaram de programas de exercícios físicos mantiveram melhores níveis da condição física e sofreram menos

angústia psicológica, fadiga e outros sintomas relacionados ao tratamento durante a quimioterapia ou radioterapia (SEGAL et al. 2001).

O exercício é capaz de atenuar a perda de massa muscular induzida pela síndrome da caquexia e de aumentar a sobrevida de roedores inoculados com tumor (AL-MAJID & McCARTHY, 2001b). A atividade física promove efeitos benéficos para a síntese protéica e promove a redução da concentração de cortisol (importante indutor de proteólise), preservando assim os níveis de massa muscular do indivíduo, mesmo com a presença do tumor em constante competição com o organismo por nutrientes (DANERYD et al., 1995). Além de preservar a massa muscular, o exercício proporciona, aos pacientes com câncer que utilizam dessa prática, aumento no consumo máximo de oxigênio (McVICAR et al., 1989) redução na sensação de náuseas (WINNINGHAM & McVICAR et al., 1988), diminuição no percentual de gordura corporal e melhora na qualidade de vida (BURNHAM & WILCOX, 2002). Em modelos animais, os benefícios promovidos pelo exercício físico incluem: inibição da tumorigênese (BARRACOS, 1989), diminuição da taxa de crescimento tumoral e do aparecimento de metástases (NUNES, 2005), além do aumento da síntese protéica muscular (AL-MAJID & McCARTHY, 2001b).

1.2.1 CÂNCER E EXERCÍCIO AERÓBICO

O exercício aeróbico tem por característica, alto número de repetições, executadas por longos períodos, contra uma sobrecarga relativamente baixa (AL-MAJID & McCARTHY, 2001a), como a caminhada, natação ou corrida em esteira. Atividades com essas características têm a capacidade, em indivíduos saudáveis, de aumentar a resistência muscular à fadiga, devido às adaptações musculares proporcionadas por este tipo de exercício. Dentre as adaptações estão: aumento do número de vasos sanguíneos musculares; aumento do número de mitocôndrias e aumento da atividade das enzimas mitocôndrias, o que acarreta em melhora da capacidade oxidativa muscular (HOLLOSZY & COYLE, 1984; SPINA et al., 1996).

As células musculares obtêm energia por duas vias metabólicas. Na primeira via, carboidratos e gorduras são oxidados e produzem água e gás carbônico na mitocôndria. A energia produzida é armazenada na forma de adenosina trifosfato (ATP). Este processo só ocorre na presença de oxigênio, sendo denominado de

aeróbico. Quando a quantidade de oxigênio se encontra reduzida, as células utilizam uma segunda via metabólica, denominada de anaeróbica. Nesta via, a glicose é metabolizada, gerando ATP e ácido láctico. O fornecimento de oxigênio para as cristas mitocôndriais é fator crítico na regulação da produção de energia. A entrada adequada de oxigênio para as células depende da integridade de todas as ligações em cadeia complexa que regulam a captação de oxigênio, transporte e difusão. Várias mudanças funcionais e anatômicas devido ao tratamento contra o câncer podem afetar o fornecimento de oxigênio para as células. Alterações da árvore brônquica, perfusão pulmonar, superfície alveolar, funções cardíacas e concentração de enzimas oxidativas nas células musculares podem ser afetadas pelo fornecimento reduzido de oxigênio. Tanto o câncer como seu tratamento podem produzir prejuízo na entrada de oxigênio pela via aeróbica acarretando em deficiência na produção de energia (DIMEO, 2001).

Por muitos anos a recomendação médica para pacientes com câncer era o repouso, evitando assim esforços físicos. Esta orientação era prescrita de forma empírica, porque a doença e seu tratamento estavam associados com mudanças funcionais que resultavam em menor desempenho físico e o exercício poderia potencializar sintomas como fadiga, falta de ar e taquicardia. Porém, a inatividade física gera perda de massa muscular e da capacidade cardiorespiratória. Estudos realizados nos últimos anos esclareceram conceitos relacionados ao exercício físico, fadiga em pacientes com câncer. Informações advindas desses estudos mostraram que o exercício pode diminuir o quadro de fadiga em pacientes com câncer durante e após o tratamento. Estes resultados estão relacionados aos ganhos adaptáveis do exercício físico, como aumento de massa muscular, melhora no sistema cardiorespiratório e maior concentração de enzimas oxidativas no músculo (BRAITH et al., 1998).

Estas alterações decorrentes da prática de exercícios físicos são o oposto daquilo causado pelo câncer e seu tratamento. Em estudo realizado com bicicleta estacionária, pacientes com câncer de mama, submetidos à quimioterapia foram treinados durante 10 semanas, 30 minutos, três vezes por semana, obtendo aumento significativo do desempenho físico quando comparados com os do grupo controle. Em outro estudo, pacientes que realizaram transplante de medula óssea participaram de um programa de exercícios físicos durante seis semanas, com

caminhadas diárias, durante 30 minutos. Ao final do programa de treinamento, todos apresentaram melhor condicionamento físico e menor concentração de lactato durante a caminhada a uma velocidade submáxima de 5 Km/h (DIMEO et al., 1996). Em outro estudo realizado por DIMEO et al. (1997), pacientes portadores de tumores sólidos submetidos ao tratamento de quimioterapia participaram de um programa de exercício aeróbico durante o período de hospitalização que constituía de 30 minutos de atividade, em bicicleta estacionária. O exercício era realizado durante 1 minuto com intensidade suficiente para alcançar 50% da frequência cardíaca de reserva. O procedimento foi realizado 15 vezes com intervalo de um minuto a cada um minuto de exercício. Entre os vários resultados positivos encontrados nos pacientes que realizaram o treinamento aeróbico durante o período de hospitalização, destacou-se que a taxa de neutropenia no grupo treinado foi significativamente menor que a do no grupo controle. Uma das principais complicações após o tratamento quimioterápico era a neutropênia. Outro ponto observado além da melhora do sistema imunitário foi a reconstituição das células epiteliais intestinais, proporcionando quadros menos severos de diarreia no grupo treinado, além de menor utilização de analgésicos e menor tempo de hospitalização.

1.2.2 CÂNCER E EXERCÍCIO CONTRA RESISTIDO

O exercício contra resistido é caracterizado pela execução de múltiplas, porém poucas repetições, envolvendo contrações musculares estáticas ou dinâmicas, executadas contra alta sobrecarga ou resistência (EVANS et al., 1998). O exercício de força tem capacidade de aumentar a massa muscular em indivíduos saudáveis, tanto em humanos (JURIMAE et al., 1996; POWERS & HOWLEY, 2000; WILMORE & COSTILL, 2001; ROBERGS & ROBERTS, 2002), quanto em modelos animais (TAMAKI et al., 1992). Esse tipo de exercício também contribui para menor perda de tecido muscular que se manifesta em idades mais avançadas (YARASHESKI et al., 1999; GREIWE et al., 2001), na síndrome da imunodeficiência adquirida (WAGNER & RABKIN, 1998; SATTER et al., 1999), na atrofia muscular por desuso (LINDERMAN et al., 1994; FERRANDO et al., 1997) e no câncer (AL-MAJID & MCCARTHY, 2001a). O treinamento de força é um componente importante de qualquer programa de treinamento para pessoas saudáveis (LUCIA et al., 2003). De

acordo com *American College of Sports Medicine ACSM* (2002), 6-7 semanas de treinamento de força são suficientes para obter resultados mensuráveis de hipertrofia muscular.

Estudo realizado por AL-MAJID & MCCARTHY (2001) demonstrou que camundongos com câncer submetidos a oito sessões de treinamento de força tiveram atenuação da perda de massa muscular e depleção protéica do músculo *extensor digitorum longus* (EDL). Esta atenuação foi paralela ao aumento no conteúdo de proteína muscular, sugerindo que o aumento no peso muscular foi devido ao aumento na massa muscular total e não devido ao edema. Em outro estudo realizado por NUNES (2005), ratos inoculados com tumor de Walker-256 foram submetidos ao protocolo de treinamento de saltos, durante 8 semanas, apresentaram diminuição no crescimento tumoral, preservação da massa corporal e atenuação de algumas mudanças no quadro metabólico causada pela síndrome da caquexia.

Segal et al. (2003) investigaram os efeitos de um programa de 12 semanas de treinamento força, avaliando os níveis de fadiga, qualidade de vida e aptidão muscular e composição corporal de 155 homens submetidos ao tratamento contra câncer de próstata. Os indivíduos do grupo exercitado apresentaram menor quadro de fadiga, melhora na qualidade de vida, maior aptidão muscular quando comparados com o grupo controle.

1.3 ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS

Desde 1960, estudos epidemiológicos sugerem correlação entre ácidos graxos e aparecimento de tumores. Há estimativa que 30% de todos os casos estejam ligados à dieta, demonstrando que consumo excessivo de gorduras saturadas e ácidos graxos n-6 e baixa ingestão de ácidos graxos n-3, facilitam o aparecimento de doenças cardiovasculares e câncer (McENTEE, et al., 2002). Os hábitos alimentares são fatores ambientais importantes, considerando que os genes da espécie humana hoje são similares aos genes de nossos ancestrais de 40 milhões de anos atrás, enquanto que mudanças alimentares tomaram lugar apenas nos últimos 100 anos estimuladas pelas Revoluções Agrícola e Industrial. Estudo evolutivo da dieta humana mostra que nossos ancestrais, do período Paleolítico,

consumiam grande quantidade de proteínas, cálcio, potássio e agentes antioxidantes. Com a industrialização, houve aumento das calorias obtidas a partir das gorduras, em particular das saturadas e ácidos graxos n-6, associado a decréscimo na ingestão de n-3, antioxidantes e cálcio, em particular nas populações ocidentais. Este aumento no consumo de n-6 nos últimos 100 anos (FIGURA 2) foi devido ao desenvolvimento da tecnologia na extração de óleos vegetais para uso na culinária doméstica (SIMOPOULOS, 2002).

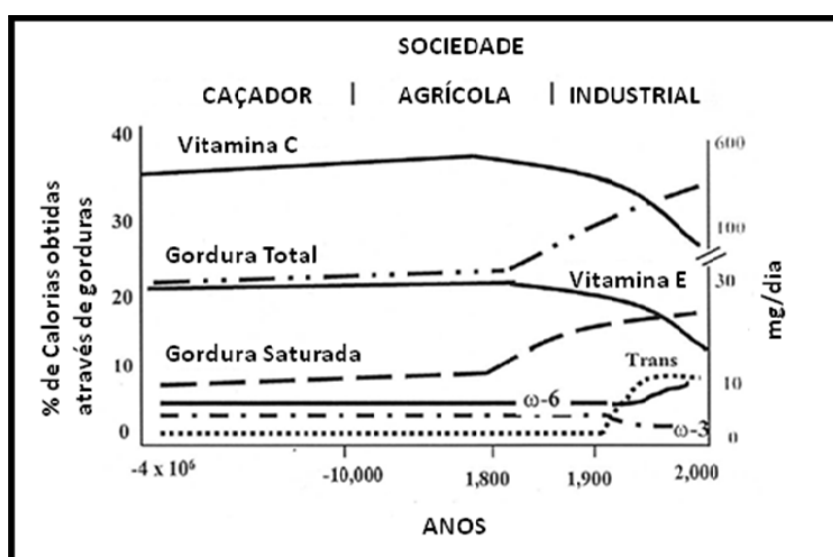


FIGURA 2: Perfil do consumo de gordura e ácidos graxos da espécie humana ao longo dos anos. Adaptado de SIMOPOULOS, 2002.

Ácidos graxos poliinsaturados são aqueles que apresentam duas ou mais duplas ligações em sua cadeia hidrocarbônica, sendo que os ácidos graxos n-6 possuem a primeira dupla ligação no sexto átomo de carbono, contando-se a partir da extremidade metila da molécula. Os ácidos graxos n-3 apresentam a primeira insaturação no terceiro átomo de carbono. O ácido linoléico (18:2n-6) é um exemplo de ácido graxo n-6 com 18 átomos de carbono e 2 duplas ligações, enquanto que o ácido α -linolênico (18:3n-3) pertence à família dos ácidos graxos n-3 e apresenta 18 átomos de carbono e 3 duplas ligações. Estes dois ácidos graxos não podem ser sintetizados por mamíferos, incluindo os seres humanos, portanto devem ser obtidas da dieta, sendo assim, considerados ácidos graxos essenciais (DOMMELS et al., 2002; ROSE & CONNOLLY, 1999).

Existem três famílias importantes de ácidos graxos: a n-9, representada pelo ácido oléico; a n-6, derivada do ácido linoléico (LA); e a n-3, derivada do ácido α -linolênico (ALA) (FIGURA 3).

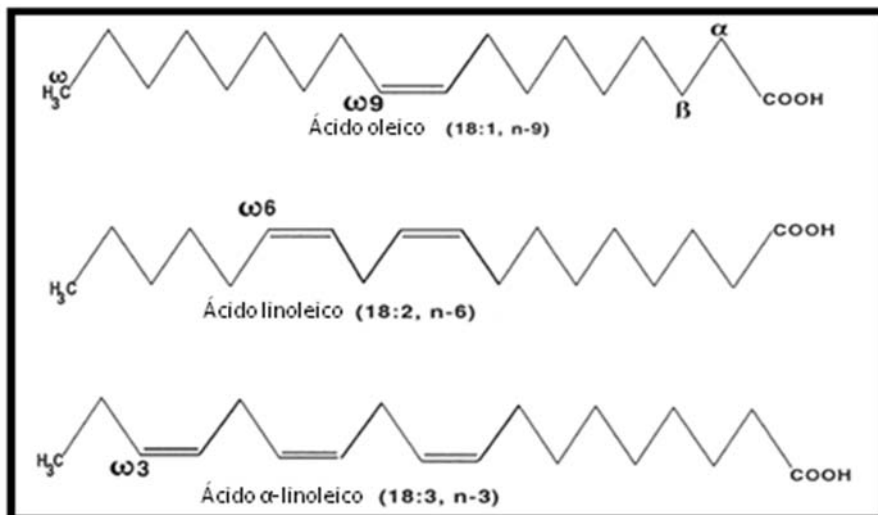


FIGURA 3: Representação esquemática das diferentes famílias de ácidos graxos. Adaptado de ROSE & CONNOLLY, 1999.

Através dos processos de alongamento e desnaturação, presente no retículo endoplasmático liso, ácidos graxos como linoléico (18:2n-6) e α -linolênico (18:3n-3), adquirem novas duplas ligações e sofrem alongamento de cadeia, dando origem a vários outros ácidos graxos de cadeia longa, entre eles os ácido araquidônico (AA 20:4n-6) eicosapentaenóico (EPA 20:5n-3) e docosahexaenóico (DHA 22:6n-3) (DOMMELS et al, 2002). (FIGURA 4) O ácido araquidônico (n-6) e o ácido eicosapentaenóico (n-3) dão origem a eicosanóides através das enzimas cicloxigenase (COX) e lipoxigenase (LOX). Eicosanóides são moléculas compostas por 20 átomos de carbonos que desempenham funções específicas nas células, entre as quais, potentes sinalizadores que agem como mensageiros de curta duração e distância, afetando os tecidos circunvizinhos. Os eicosanóides são as prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanas. A enzima cicloxigenase catalisa a conversão do ácido araquidônico e do EPA em prostanóides (WILLIAMS & DUBOIS, 1999). Existem duas importantes isoformas de COX: a COX-1, que é expressa constitutivamente em muitos tecidos; e a COX-2, associada a respostas inflamatórias e induzidas por vários tipos de estímulos incluindo citocinas, promotores tumorais e fatores de crescimento (CAO et al., 1996)

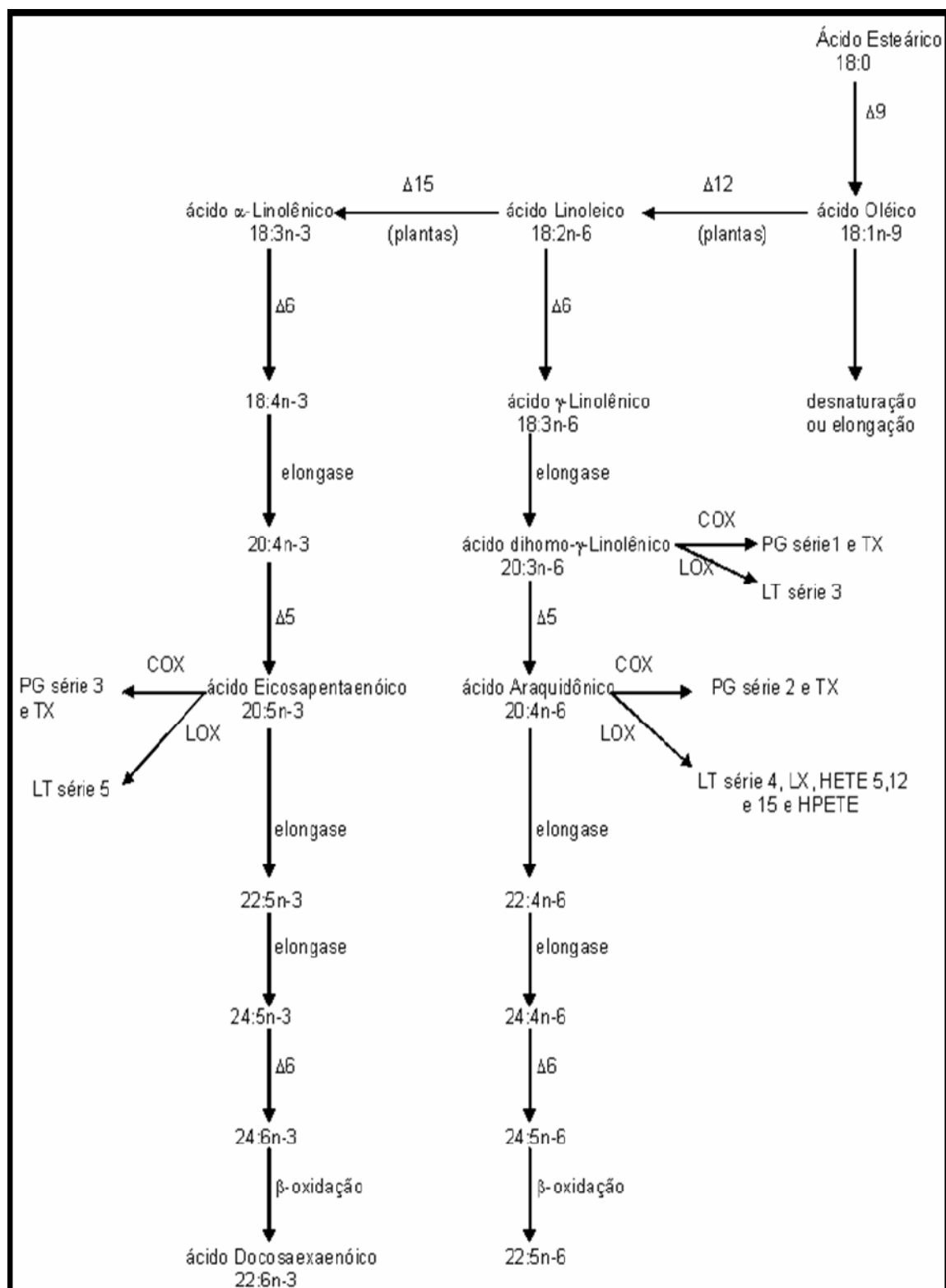


FIGURA 4: Metabolismo de ácidos graxos n-3 e n-6. Adaptado de CALDER (1998).

1.3.1 ÓLEO DE FÍGADO DE TUBARÃO

O óleo de fígado de tubarão é constituído de 30 a 50% por alquilgliceróis, gorduras formadas por uma cadeia hidrocarbônica, saturada ou insaturada, unida por ligação do tipo éster a uma das hidroxilas do glicerol (FIGURA 5) (BROHULT et al. , 1977). Ésteres lipídicos são substâncias químicas com pronunciada atividade biológica. Os alquilgliceróis também estão presentes na medula óssea humana, no leite materno e no leite de vaca.

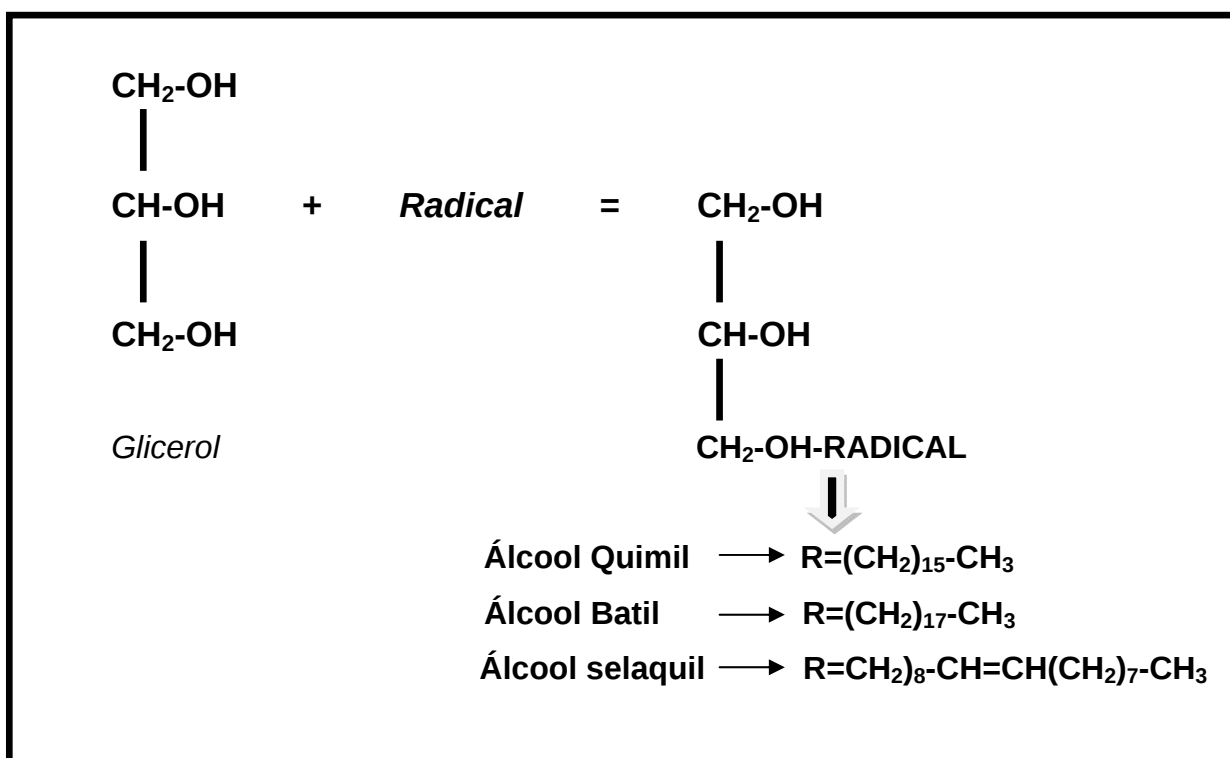


FIGURA 5: Estrutura química das moléculas de alquilglicerol mais comuns.

A presença de grupo metóxi (-OCH₃), no início da cadeia alifática em substituição ao hidrogênio (FIGURA 6), confere estimulação da resposta imunológica e imunomodulação, atividade antifúngica e, em culturas de células, demonstraram ter efeitos citotóxicos sobre células tumorais e redução de metástases (BROHULT, et al., 1986). Em fontes naturais, os alquilgliceróis são encontrados sob a forma esterificada, ou seja, ligada a ácidos graxos principalmente poliinsaturados unidos por ligações éster às duas hidroxilas livres do glicerol sendo assim denominados de alquildiacilgliceróis (BROHULT, 1962). Estudos realizados com o alquilglicerol 1-O-

(2-metóxi) hexadecilglicerol revelaram sua capacidade, em pequenas concentrações (μM), em inibir a proliferação de células tumorais humanas de próstata (REYNOLDS et al, 2000).

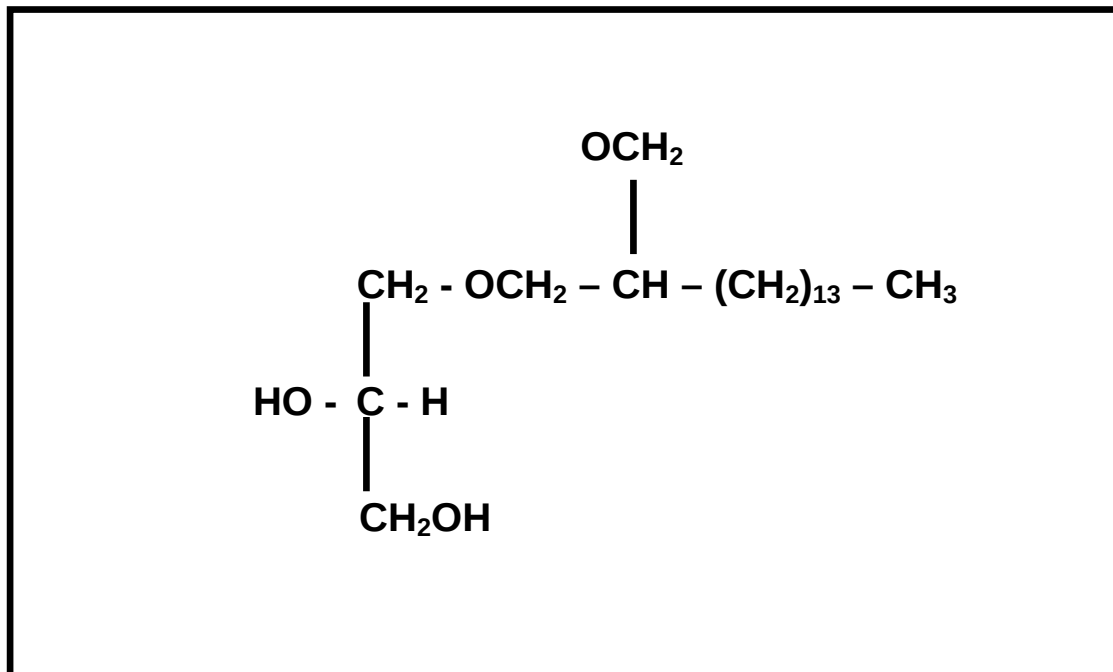


FIGURA 6: Estrutura química do 1-O-(2-metóxi)-hexadecilglicerol, um alquilglicerol metóxi substituído encontrado no óleo de fígado de tubarão.

Estudos que buscaram verificar os efeitos do alquilglicerol sobre a redução da proliferação celular em diferentes linhas de cânceres humanos, demonstraram redução significativa na colônia de células tumorais da próstata, aumento da apoptose tanto na próstata quanto ovário, e predominante necrose em carcinomas mamários (KROTKIEWSKI et al., 2003). Seus efeitos também estão relacionados à prevenção de leucopenia e trombocitopenia, e a sua administração em pacientes com câncer de colo uterino resultou em taxas de sobrevivência mais altas comparando-se apenas à administração da terapia radioativa. Em experimentos realizados com suplemento oral com cápsulas (0,1g de alquilglicerol), de duas a três vezes ao dia, totalizando 0,6g ao dia antes da terapia radioativa, percebeu-se regressão do crescimento tumoral. Além disso, os efeitos colaterais decorrentes da terapia por radiação foram reduzidos pela administração de alquilgliceróis, bem como os efeitos colaterais mais complexos decorrentes dos danos provocados pela

uma importante função anti-apoptótica, que é regulada por multi-sítios de fosforilação envolvendo interações entre várias proteínas da família (YAMAMOTO et al., 1999). Concentrações elevadas de proteínas dessa família de genes bloqueiam a apoptose (Bcl-2 e Bcl-x) e outras a promovem (Bax, Bad e Bak). Os genes anti-apoptóticos da família Bcl-2 são promotores da sobrevivência celular por inibirem a ocorrência da apoptose (VERMEULEN et al., 2003). A proteína Bcl-2 está localizada na membrana mitocondrial externa de diferentes tipos celulares, como epitélios capazes de proliferação e morfogênese. Dentre suas atuações está o bloqueio da liberação de citocromo-c pela mitocôndria após estímulo apoptogênico, impedindo, portanto, a ativação de caspases (YAMAMOTO et al., 1999). A proteína Bax pode produzir heterodímeros com a Bcl-2 (Bax/Bcl-2) ou homodímeros (Bax/Bax), desta forma, Bcl-2 suprime a morte celular quando heterodimerizada com Bax; por outro lado, o homodímero Bax/Bax promove apoptose. O mecanismo de controle da apoptose pelos genes da família Bcl-2 envolve a formação de poros na membrana mitocondrial, permitindo a interação de várias proteínas envolvidas na regulação da morte celular (VERMEULEN et al., 2003).

Diversas vias de sinalização celular para apoptose são o resultado de uma cascata de complexos eventos biológicos. Entre esses eventos podemos observar as caspases que compreendem uma família de proteases que contêm cisteína no sítio ativo e clivam substratos em resíduos de aspartato (NICHOLSON & THORNBERRY 1997). Caspases são sintetizadas em células saudáveis como pro-enzimas inativas, que podem ser ativadas rapidamente por clivagem (THORNBERRY & LAZEBNIK 1998). Atualmente são conhecidos 14 membros da família das caspases e sete deles são identificados como mediadores de apoptose. Durante o processo de apoptose as caspases são divididas em caspases de iniciação (8 e 10) e de execução (3, 6 e 7). As caspases 3, 6 e 7 são ativadas pelas caspases 8 e 10 e pela presença do citocromo c; este é liberado pela mitocôndria que interage com adenosina trifosfato (ATP), fator ativador de apoptose 1 (apaf-1) e pró-caspase 9 que são ativadas pela formação do apoptossomo levando à apoptose (HUERTA et. al., 2006).

2. JUSTIFICATIVA

A síndrome da caquexia e o crescimento tumoral são os maiores contribuintes para a morbidade e mortalidade dos pacientes com malignância avançada. Cerca de dois terços dos pacientes terminais de câncer apresentam essa síndrome, que se caracteriza pela perda severa de peso (tecido adiposo e massa muscular), fadiga, anorexia, saciedade precoce, sarcopenia, anemia e edema. Essas características são acompanhadas por mudanças no metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídios (TISDALE, 2001). Desta forma, intervenções para preservar a massa muscular têm importantes implicações clínicas e valor funcional em termos de melhorar o prognóstico e a qualidade de vida dos pacientes com câncer (HESPEL et al., 2001; AL-MAJID & MCCARTHY, 2001). Entre as várias intervenções o suporte dietético e o exercício físico têm sido cogitados e demonstram ter efeitos anti-tumorais e anti-caquéticos.

3. OBJETIVOS

Estudos demonstram que o exercício físico tem a capacidade de promover efeitos benéficos no câncer e que o óleo de fígado de tubarão tem a habilidade de reduzir a proliferação de células tumorais. Uma vez que o exercício físico e o óleo de fígado de tubarão atuam sobre o desenvolvimento tumoral, o objetivo deste estudo foi investigar o efeito do exercício físico associado à suplementação com óleo de fígado de tubarão sobre parâmetros bioquímicos de caquexia e vias de crescimento tumoral.

Para alcançar estes objetivos, os seguintes parâmetros foram analisados:

- Massa do tumor e massa corpórea dos animais;
- Proliferação das células tumorais *ex vivo* pela incorporação de [2-¹⁴C]-timidina em DNA;
- Glicemia, lactatemia e triacillicerolemia plasmáticas;
- Apoptose por citometria de fluxo;
- Lipoperoxidação de células tumorais;
- Expressão de proteínas envolvidas na sinalização de morte celular Bax e Bcl-2.

4. MATERIAS E MÉTODOS

4.1 MODELO EXPERIMENTAL E PROCEDIMENTOS

4.1.1 ANIMAIS

Para a realização deste estudo foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar (70 dias), obtidos do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Metabolismo Celular do Departamento de Fisiologia do Setor de Ciências Biológicas da UFPR. Todo o procedimento experimental foi aprovado pelo comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEAA) do Setor de Ciências Biológicas, número 293.

4.1.2 MODELO EXPERIMENTAL

Os animais foram permaneceram em ciclo invertido claro/escuro (12/12 horas), com temperatura controlada de $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$, com livre acesso à água e comida, sendo divididos aleatoriamente em 8 grupos: Sedentário (S), Sedentário suplementado com óleo de fígado de tubarão (SA), Sedentário portador de tumor (SW), Sedentário portador de tumor suplementado com óleo de fígado de tubarão (SWA), Exercitado (EX), Exercitado suplementado com óleo de fígado de tubarão (EXA), Exercitado com tumor (EXW), Exercitado com tumor e suplementado com óleo de fígado de tubarão (EXWA). Na sexta semana de treinamento 1 mL de suspensão contendo 3×10^7 células do tumor de Walker-256 foi inoculada no flanco direito dos animais, identificados pela letra W como portadores do tumor. Após 15 dias da inoculação, coincidindo com a oitava semana de treinamento, os animais foram ortonasados.

4.1.3 SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE FÍGADO DE TUBARÃO

Os grupos suplementados com óleo de fígado de tubarão, identificados pela letra A, receberam 1g/kg p.c de óleo de fígado de tubarão, obtido de uma

preparação de lipídeos obtidos do fígado de tubarão (cápsulas de 250g de Ecomer IMUNI SHARK®), por gavagem durante 8 semanas.

4.1.4 MASSA CORPÓREA E DO TUMOR

O peso dos animais foi monitorado duas vezes por semana no período da manhã, sempre antes do treinamento, utilizando-se balança Urano. Após a ortotanasia, o tumor foi retirado e pesado em balança digital (Denver XL-4-1).

4.1.5 PROTOCOLO DE TREINAMENTO

Após um período de adaptação ao meio aquático (30 minutos de natação por dia durante 2 dias sem utilização de carga), os animais dos grupos exercitados, identificados por EX, realizaram um programa de treinamento físico, constituído de 6 séries de saltos e 30 minutos de natação em tanque com água, temperatura constante de $32 \pm 2^{\circ}\text{C}$. O treinamento de saltos foi constituído de 6 séries de saltos com 1 minuto de intervalo e sobrecarga de 50% do seu peso corporal (atualizada semanalmente), acoplada ao tórax. Cinco minutos após o término do treinamento de saltos os mesmos grupos exercitados foram submetidos ao protocolo de treinamento de natação, o qual é constituído de 30 minutos de natação com uma carga equivalente a 6% do peso corpóreo do animal (atualizada semanalmente), presa ao tórax. Foram realizadas 4 sessões semanais de treinamento, com descanso nas quartas-feiras e fins de semana, durante o período de 8 semanas. Após a inoculação das células tumorais, na sexta semana de treinamento não houve aumento da carga e o treinamento continuou por mais duas semanas, coincidindo com o décimo quinto dia de inoculação do tumor.

4.1.6 ORTOTANÁSIA DOS ANIMAIS

Após a oitava semana de treinamento coincidindo com o décimo quinto dia de inoculação do tumor, foi realizada a ortotanásia dos animais com o auxílio de guilhotina. Este método foi utilizado para facilitar a retirada do volume necessário de sangue para as análises séricas.

4.2 METODOLOGIA PARA ENSAIOS DO TUMOR DE WALKER-256

4.2.1 OBTENÇÃO E TRANSPLANTE DAS CÉLULAS DE TUMOR DE WALKER-256

Uma suspensão de 2×10^7 células de tumor de Walker-256, 1 mL, foi injetado intraperitonealmente em um rato macho da linhagem Wistar. Após um período de aproximadamente 5 dias, quando constatada ascite, o animal foi sacrificado por deslocamento cervical e 10mL de solução salina 0,9% foram injetados em sua cavidade abdominal. Seu abdômen foi massageado e, por meio de laparotomia mediana foi retirado da cavidade abdominal o fluido contendo as células tumorais, com auxílio de pipeta, tipo Pasteur, de plástico. As células tumorais obtidas foram contadas em câmara de Neubauer, após serem coradas com azul de trypan, 10g/L em solução salina 0,9% (NaCl 154mM).

4.3 ANÁLISES PLASMÁTICAS

4.3.1 MENSURAÇÃO DA GLICEMIA

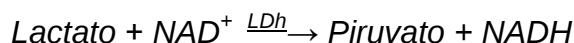
A glicose foi quantificada por método colorimétrico, utilizando-se sistema comercial Glicose E enzimática da Labtest. Os ensaios foram realizados segundo as instruções do fabricante.

4.3.2 MENSURAÇÃO DO LACTATO

Foi mensurado pelo método enzimático, segundo ENGLE & JONES (1978). Inicialmente foi feito a desproteinização do soro, pela adição de 50 µL de ácido tricloroacético (TCA a 25%) a 0,5 mL da amostra e a mistura foi agitada em vórtex, centrifugada por 1 minuto a 13.000 rpm em centrífuga Eppendorf modelo 5810R. Em seguida, foi coletado 200 µL do sobrenadante e adicionou-se 4 µL de indicador universal para permitir a visualização da neutralização do soro, pela adição de KOH/TRIS (0,5 M/2 M), sinalizada pela coloração verde, indicando pH 7,0. Deste volume neutralizado pipetou-se 100 µL em tubos de ensaio contendo 1 mL do

tampão do ensaio (descrito abaixo) e, após 45 minutos, foi feita leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 340 nm (Pharmacia 4300 Pro).

O princípio dessa mensuração consiste na conversão do lactato a piruvato pela ação da lactato desidrogenase (LDh), ocorrendo consumo de NAD^+ com formação estequiométrica de NADH, o qual pode ser monitorado espectrofotometricamente, fornecendo as concentrações de lactato existente na amostra. Segundo a reação:



A partir da medida da absorbância calculou-se a concentração do lactato sérico em $\mu\text{mol/mL}$, pela fórmula:

$$[\text{Lactato}] = \frac{\text{Abs}}{6,22} \times \frac{V_1}{V} \times \frac{V_2}{V_3} \times \frac{V_4}{V_5}$$

[Lactato] = concentração de lactato produzida

Abs = Absorbância

6,22 = constante

V = volume da amostra

V1 = volume da amostra + tampão de ensaio

V2 = volume do soro com proteínas + TCA

V3 = volume do soro com proteínas

V4 = volume do soro desproteinizado + volume de neutralização

V5 = volume do soro desproteinizado

Tampão de Ensaio (para 100 mL de H₂O destilada)	
EDTA	0,28 g
Glicina	2,8 g
Hidrato de Hidrazina	1,5 mL
LDh	0,4 mL
NAD^+	60 mg
pH	8,85

4.4 PROLIFERAÇÃO CELULAR

Uma vez isoladas as células do tumor de Walker-256, estas foram cultivadas em meio de cultura RPMI-1640 enriquecido com 10% de soro fetal bovino e antibióticos (penicilina 10.000U e estreptomicina 10 mg/L) contendo inicialmente 1×10^5 células por poço, em placas de 96 poços (volume 200 μ L), a 37°C em atmosfera com 5% CO₂. Este método foi descrito por HUANG et al, 2000. Concomitantemente ao plaqueamento das células tumorais, foi adicionado 20 μ L de uma solução contendo (2-¹⁴C)-timidina (0,02 μ Ci/poço). As células foram cultivadas por 24 horas. A timidina é análoga da base púrica timina que incorpora-se aos novos DNAs formados durante a proliferação. Após este período, as células foram coletadas automaticamente em coletor múltiplo (Skatron Combi Multiple Cell Harvester, UK) em papéis filtro nº 11731 (Skatron Combi – UK). Neste processo não há necessidade de processos extrativos preparatórios para obtenção de DNA celular. Os discos de papéis contendo a radioatividade incorporada no DNA foram transferidos para tubos contendo 1 mL de líquido de cintilação e levados para contagem da radioatividade em contador Beckman LS 6000.

4.5 APOPTOSE EM CÉLULAS TUMORAIS

Este processo foi realizado conforme descrito por AMARANTES-MENDES (1997), onde células tumorais (5×10^5 células/poço) foram ressuspensas em tampão contendo anexina V marcada com o fluorocromo fluoresceína (FITC) e mantidas protegidas da luz, em geladeira, por 24 horas. A anexina V é marcador de apoptose, pois se liga ao fosfolípídio fosfatidilserina, externalizado da membrana interna para a membrana externa plasmática, durante o início do processo de apoptose. A fluorescência celular foi avaliada por citometria de fluxo (FACS - *fluorescence activated cell sorter*), pela fluorescência da anexina V por célula (absorbância de 488 nm e emissão acima de 530 nm – canal FL1). Os dados foram expressos em porcentagem de fluorescência.

4.6 PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

A peroxidação lipídica foi mensurada pelo método descrito por NOUROOZ-ZADEH et al. (1994). Este método quantifica a formação de hidroperóxido por miligrama de proteína durante a peroxidação lipídica. Baseia-se no princípio de que hidroperóxidos oxidam ferro a íon férrico e, por sua vez, este íon liga-se ao corante xilenol laranja.

Duzentos gramas de amostra de tumor de Walker 256 foram homogeneizados em 1mL de metanol e centrifugados a 5.000g por 5 minutos a 4°C. Para cada amostra, alíquotas de 90 µL do sobrenadante foram postas em 6 tubos de centrífuga (1,5 mL de capacidade). Três destes tubos foram adicionados 10 µL de solução metanólica de TPP (trifenilfosfina) a 10 mM, para haver a redução seletiva de hidroperóxidos. As amostras contidas nos três tubos restantes receberam apenas 10 µL de metanol. Todos os tubos foram agitados e então incubados em temperatura ambiente por 30 minutos. Terminada esta incubação, adicionou-se a cada tubo 900 µL do reagente FOX2 (xilenol laranja a 100 µM, hidroxitolueno butilado a 400 mM, ácido sulfúrico a 25 mM e sulfato ferroso de amônia em metanol 90%). Após agitação, o meio reacional foi incubado em temperatura ambiente por mais 30 minutos. A leitura foi realizada em espectrofotômetro na absorvância de 560 nm.

Para a determinação da concentração de hidroperóxidos nas amostras, subtraiu-se o valor da absorvância das amostras tratadas com TPP do valor da absorvância das amostras sem TPP. O valor obtido foi, então, interpolado na curva padrão de peróxido de hidrogênio, a qual foi obtida com soluções padrão de peróxido de hidrogênio, de diferentes concentrações (100.0, 50.0, 25.0, 12.5, 6.2, 3.1 e 1.6 µM) submetidas aos mesmos procedimentos descritos acima para a dosagem de hidroperóxidos (com exceção ao tratamento com TPP). Dividiu-se o valor da concentração de hidroperóxidos (nmol/mL) pela concentração de proteínas (mg/mL), obtendo-se assim o valor de hidroperóxidos por quantidade de proteínas no sobrenadante do extrato (nmol de hidroperóxidos/mg de proteínas).

4.7 DETERMINAÇÃO DA QUANTIFICAÇÃO PROTÉICA PARA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

Amostras de 200 mg de tumor foram homogeneizadas em metanol na proporção de 1:5 com auxílio de homogeneizador de tecidos, centrifugadas por 5 minutos a 5.000g e o sobrenadante coletado para quantificação protéica.

A quantificação de proteína foi realizada pelo método de Bradford (1976), que utiliza o corante Coomassie Blue G 250 que se liga à proteína resultando em coloração azul, calculada com base em curva padrão de proteína conhecida. Foram plaqueados 250 µL de solução de Bradford e 10 µL de cada um dos padrões ou das amostras (4 réplicas) em placas de 96 poços, sendo a leitura realizado no leitor de microplacas (Bio-Rad Microplate Reader – Benchmark) a 595 nm.

4.8 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA COM DODECIL SULFATO DE SÓDIO – (SDS-PAGE)

O método "SDS-PAGE" descrito por Laemmli em 1970 foi desenvolvido para que esta migração dependa unicamente do tamanho da proteína. O SDS (dodecil sulfato de sódio) é um poderoso detergente carregado negativamente que se liga a regiões hidrofóbicas das proteínas. O complexo formado SDS-proteína distribui carga negativa semelhante entre todas as proteínas, que migrarão ao pólo positivo do campo elétrico.

O gel de empilhamento foi preparado a 4%, permitindo que todas as proteínas migrem com a mesma velocidade no início da corrida. Chegando ao gel de separação, as proteínas começam a migrar de acordo com seus tamanhos. A concentração de poliacrilamida do gel de separação foi de 15%.

As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida em "SDS-PAGE" por cerca de 2 horas (200 V, 400 mA). Esta separação das proteínas é importante para a posterior identificação das proteínas pelo uso de anticorpos ("Western Blotting").

4.8.1 “WESTERN BLOTTING”

O método de "Western blotting" surgiu em 1979, descrito por Towbin. Após a separação das proteínas em SDS-PAGE, elas foram transferidas para membrana de nitrocelulose. Esta membrana foi submetida à incubação com tampão de bloqueio, contendo leite em pó desnatado, para bloqueio de ligação inespecífica, durante duas horas. Após este período, a membrana foi incubada em tampão de contendo o anticorpo primário contra a proteína-alvo (Bax ou Bcl-2). Para visualização da interação proteína-anticorpo foi, então, utilizado anticorpo secundário contra o anticorpo primário, sendo aquele complexado com enzima HRP ("horseradish peroxidase"). Pela adição de substrato quimioluminescente, pode-se observar em filme Kodak para radiografia as bandas correspondentes às proteínas Bax e Bcl2. Essas bandas foram analisadas por densitometria através do programa "ImageJ".

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos como média $\pm$ e.p.m. e submetidos à análise de multivariância com pós-teste de Bonferroni com significância para $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 PARÂMETROS DE CAQUEXIA

5.1.1 Glicemia

O desenvolvimento tumoral induziu hipoglicemia (mg/dL) nos grupos portadores de tumor. A glicemia do grupo sedentário portador de tumor (SW) foi significativamente menor ($p<0,05$) quando comparada à do grupo Sedentário (S). O grupo exercitado (EXW) e o grupo exercitado suplementado com óleo de fígado de tubarão (EXWA).

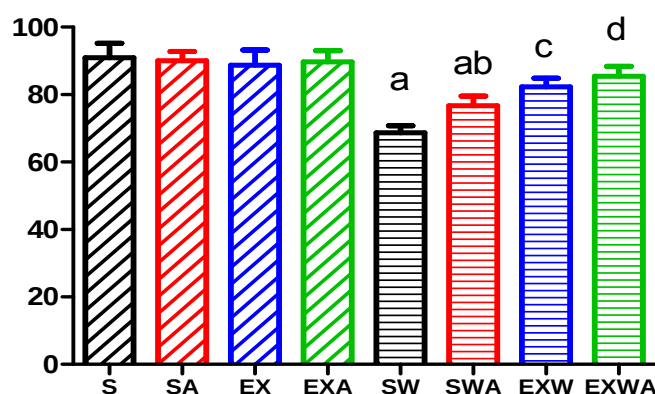


FIGURA 8: Glicemia (mg/dL) dos ratos dos grupos Sedentário (S), Sedentário suplementado com óleo de fígado de tubarão (SA), Exercitado (EX), Exercitado suplementado com óleo de fígado de tubarão (EXA), Sedentário portador de tumor (SW), Sedentário portador de tumor suplementado com óleo de fígado de tubarão (SWA), Exercitado portador de tumor (EXW) e Exercitado portador de tumor suplementado com óleo de fígado de tubarão (EXWA). O dados estão apresentados como média $\pm$ EPM de 14 animais para os grupos S, SW e EXWA, 15 animais para o grupo SA, 12 animais para os grupos EX, EXA e EXW e 15 animais para o grupo SWA.

^a $p<0,05$ quando comparado ao grupo S; ^b $p<0,05$ quando comparado ao grupo SA; ^c $p<0,05$ quando comparado ao grupo SW; ^d $p<0,05$ quando comparado ao grupo SWA.

	S	SA	EX	EXA	SW	SWA	EXW	EXWA
Glicemia (mg/dL)	90.94 ± 4.30	90.05 ± 2.72	88.74 ± 4.48	89.71 ± 3.33	68.67 ± 2.12	76.73 ± 2.82	82.27 ± 2.64	85.42 ± 2.92

5.1.2 Lactatemia

Não houve alteração da concentração de lactato plasmático nos animais sem tumor suplementados ou exercitados ($p>0,05$). A presença do tumor elevou a lactatemia (mmol/L) dos grupos SW e SWA quando comparada à do grupo S e SA, respectivamente. A suplementação com óleo de fígado de tubarão no grupo sedentário (SWA), bem como o exercitado (EXW), diminuíram a lactatemia quando comparados ao grupo SW. O exercício físico associado à suplementação com óleo de fígado de tubarão (EXWA) reduziu ainda mais quando comparado ao grupo SWA ($p<0,05$) mas não quando comparado ao grupo EXW ($p>0,05$).

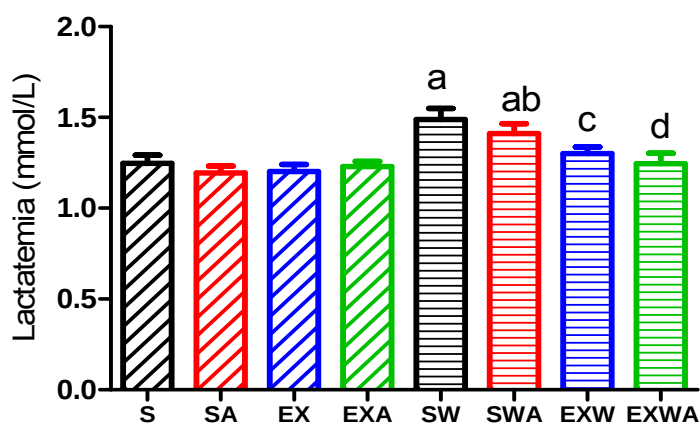


FIGURA 9: Lactatemia (mmol/L) dos grupos Sedentário (S), Sedentário suplementado com óleo de fígado de tubarão (SA), Exercitado (EX), Exercitado suplementado com óleo de fígado de tubarão (EXA) Sedentário portador de tumor (SW), Sedentário portador de tumor suplementado com óleo de fígado de tubarão (SWA), Exercitado portador de tumor (EXW) e Exercitado portador de tumor suplementado com óleo de fígado de tubarão (EXWA). O dados estão apresentados como média $\pm$ EPM de 10 animias para os grupos S, SA, SW, SWA e EXWA, 11 animais para o grupo EX e 8 animais paramos grupos EXA e EXW.

^a $p<0,05$ quando comparado ao grupo S; ^b $p<0,05$ quando comparado ao grupo SA; ^c $p<0,05$ quando comparado ao grupo SW; ^d $p<0,05$ quando comparado ao grupo SWA.

	S	SA	EX	EXA	SW	SWA	EXW	EXWA
Lactatemia (mmol/L)	1.25 $\pm$ 0.045	1.19 $\pm$ 0.039	1.20 $\pm$ 0.039	1.23 $\pm$ 0.029	1.50 $\pm$ 0.061	1.41 $\pm$ 0.055	1.30 $\pm$ 0.036	1.25 $\pm$ 0.057

5.1.3 Triacilglicerolemia

Com exceção do grupo SW que apresentou triacilglicerolemia na faixa de 161 mg/dL todos os demais grupos apresentaram triacilglicerolemia em torno de 130 mg/dL. A triacilglicerolemia do grupo SW foi significativamente maior ($p<0,05$) quando comparada à dos demais grupos.

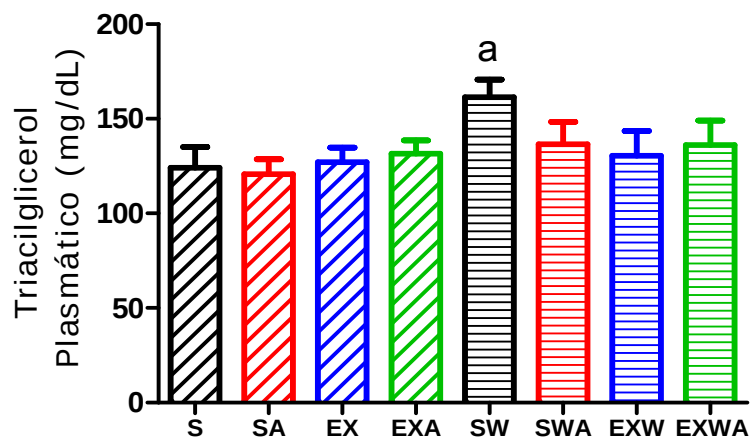


FIGURA 10: Triacilglicerolemia (mg/dL) dos grupos Sedentário (S), Sedentário suplementado com óleo de fígado de tubarão (SA), Exercitado (EX), Exercitado suplementado com óleo de fígado de tubarão (EXA) Sedentário portador de tumor (SW), Sedentário portador de tumor suplementado com óleo de fígado de tubarão (SWA), Exercitado portador de tumor (EXW) e Exercitado portador de tumor suplementado com óleo de fígado de tubarão (EXWA). O dados estão apresentados como média $\pm$ EPM de 13 animais para os grupos S, SA e SW, 12 animais para os grupos EX e EXA, 16 animais para o grupo SWA, 11 animias para o grupo EXW e 14 animais para o grupo EXWA.

^a $p<0,05$ vs. todos os grupos.

	S	SA	EX	EXA	SW	SWA	EXW	EXWA
Triacilgli- cerolemia (mmol/L)	124.1± 11.03	120.8 ± 7.86	127.1± 7.70	131.5 ± 7.01	161.4± 9.43	136.6± 11.78	130.4± 13.24	136.1± 13.02

5.2 PARÂMETROS RELATIVOS AO TUMOR DE WALKER 256

5.2.1 Peso dos tumores

Quinze dias após a inoculação do tumor, a massa tumoral teve maior desenvolvimento no grupo sedentário portador de tumor (SW $23,01 \pm 1,47$ g), sendo significativamente maior ($p < 0,05$) comparada à dos demais grupos SWA e EXW. A suplementação com óleo de fígado de tubarão (SWA) diminuiu o crescimento tumoral, assim como o exercício físico (EXW). A associação do exercício físico com a suplementação com óleo de fígado de tubarão (EXWA) teve efeito aditivo na redução do crescimento ($p < 0,05$ vs SWA e EXW).

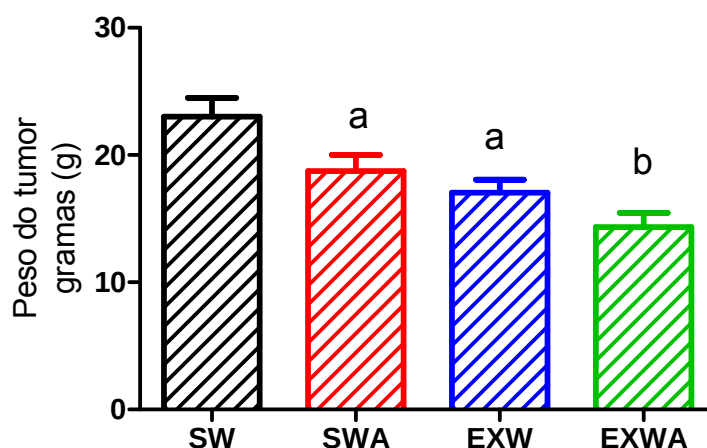


FIGURA 11: Peso do tumor (g) após 15 dias a inoculação do tumor dos grupos Sedentário portador de tumor (SW), Sedentário portador de tumor suplementado com óleo de fígado de tubarão (SWA), Exercitado portador de tumor (EXW) e Exercitado portador de tumor suplementado com óleo de fígado de tubarão (EXWA). Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM de 11 animais dos grupos SW e EXW) 16 do grupo SWA e 15 do grupo EXWA.

^a $p < 0,05$ quando comparado ao grupo SW.

^b $p < 0,05$ quando comparado ao grupo SWA e EXW.

5.2.2 Peso corpóreo antes e após implantação do tumor

A maior perda de peso foi no grupo sedentário portador de tumor (SW), aproximadamente 11 g em 15 dias após a inoculação do tumor. Todos os grupos perderam peso, mas em menor intensidade quando comparados com o grupo SW ($p < 0,05$).

TABELA 1: Peso dos indivíduos antes e 15 dias após a inoculação do tumor, peso dos tumores ao final de 15 dias e variação de peso no mesmo período.

	Peso (g) no dia da inoculação do tumor	Peso (g) 15 dias após a inoculação do tumor	Ganho de peso (g) bruto 15 dias após a inoculação	Peso (g) do tumor 15 dias após inoculação	Ganho de peso (g) real 15 dias após inoculação do tumor
S	351,9 ± 6,81	364,3 ± 7,22	12,37 ± 2,00	-	12,37 ± 2,00
SA	337,2 ± 8,23	349,8 ± 8,58	12,60 ± 2,10	-	12,60 ± 2,10
EX	328,2 ± 6,10	333,4 ± 6,41	5,20 ± 1,13	-	5,20 ± 1,13
EXA	337,3 ± 7,80	342,3 ± 8,10	5,00 ± 1,23	-	5,00 ± 1,23
SW	352,5 ± 9,02	366,1 ± 10,38	11,59 ± 1,80	23,01 ± 1,47	- 11,42 ± 2,17 ^a
SWA	360,6 ± 7,04	375,0 ± 7,45	14,48 ± 1,54	18,74 ± 1,27	- 4,26 ± 2,41 ^{bc}
EXW	328,8 ± 5,70	341,3 ± 6,37	12,58 ± 1,22	17,04 ± 1,03	- 4,46 ± 1,85 ^c
EXWA	319,8 ± 7,35	329,8 ± 7,40	9,94 ± 1,60	14,35 ± 1,12	- 4,41 ± 2,00

^a $p < 0,05$ quando comparado ao grupo S.

^b $p < 0,05$ quando comparado ao grupo SA.

^c $p < 0,05$ quando comparado ao grupo SW.

5.2.3 Proliferação de células tumorais “ex vivo”

Na figura 12 estão representados os dados de proliferação de células tumorais cultivadas “ex vivo” durante 24 horas em contagem por minuto (cpm). No grupo sedentário com tumor (SW), a proliferação celular foi de aproximadamente 1124 cpm. A suplementação com óleo de fígado de tubarão (SWA) reduziu significativamente a proliferação ($p < 0,05$) a qual foi de 840 cpm. O exercício físico (EXW) induziu efeitos similares à do SWA e a proliferação foi de 784 cpm ($p < 0,05$ vs SW). A associação da suplementação com óleo de fígado de tubarão e exercício físico reduziu ainda mais a proliferação celular, a qual foi significativamente diferente quando comparada à dos grupos SW, SWA e EXW ($p < 0,05$).

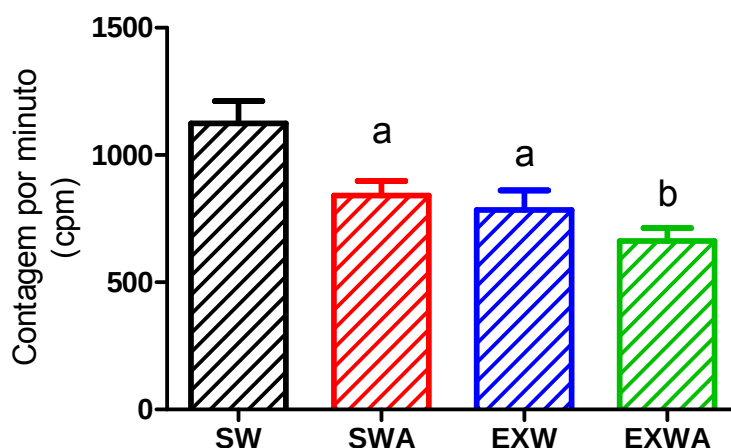


FIGURA 12: Proliferação de célula tumoral “ex vivo” em contagem por minuto (cpm) das células do tumor de Walker –256, após 24 horas de cultivo presença de $[(2-^{14}\text{C})\text{-}^{14}\text{C}]$ - Timidina em DNA, obtidas dos animais dos grupos Sedentário portador de tumor (SW), Sedentário portador de tumor suplementado com óleo de fígado de tubarão (SWA), Exercitado portador de tumor (EXW) e Exercitado portador de tumor suplementado com óleo de fígado de tubarão (EXWA).

^a $p < 0,05$ quando comparado ao grupo SW.

^b $p < 0,05$ quando comparado ao grupo SWA e EXW.

5.2.4 Lipoperoxidação

O exercício físico (EXW), a suplementação como óleo de fígado de tubarão (SWA), assim como a associação das duas intervenções (EXWA) foram capazes de induzir a produção de aproximadamente 34% mais hidroperóxidos (nmol/mg proteína) quando comparados ao grupo sedentário portador de tumor (SW) ($p < 0,05$).

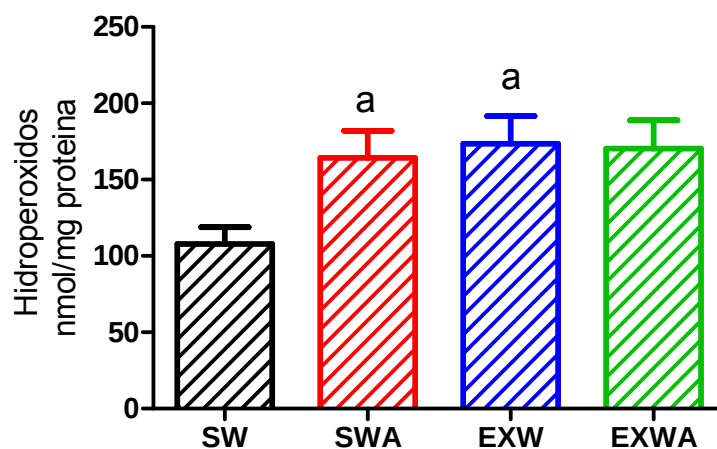


FIGURA 13: Lipoperoxidação (nmol/mg proteína no tumor) dos animais dos grupos Sedentário portador de tumor (SW), Sedentário portador de tumor suplementado com óleo de fígado de tubarão (SWA), Exercitado portador de tumor (EXW) e Exercitado portador de tumor suplementado com óleo de fígado de tubarão (EXWA). Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM de 11 animais dos grupos SW e EXW 16 do grupo SWA e 15 do grupo EXWA.

^a $p < 0,05$ quando comparado ao grupo SW.

5.2.5 “Western blotting” de proteínas do tumor de Walker 256

5.2.5.1 Razão Bax/Bcl-2

A expressão de Bax nos grupos exercitado portador de tumor (EXW) e exercitado portador de tumor suplementado com óleo de fígado de tubarão (EXWA), foi maior ($p < 0,05$) quando comparada à dos grupos SW e SWA, respectivamente

(FIGURA 14 A). Bcl-2 teve sua expressão diminuída ($p<0,05$) nos grupos SWA, EXW e EXWA ($p<0,05$) (FIGURA 14 B). A razão da expressão das proteínas Bax/Bcl-2 aumentou ($p<0,05$) somente nos grupos exercitado (EXW) e exercitado e suplementado com óleo de fígado de tubarão (EXWA) (FIGURA 14C).

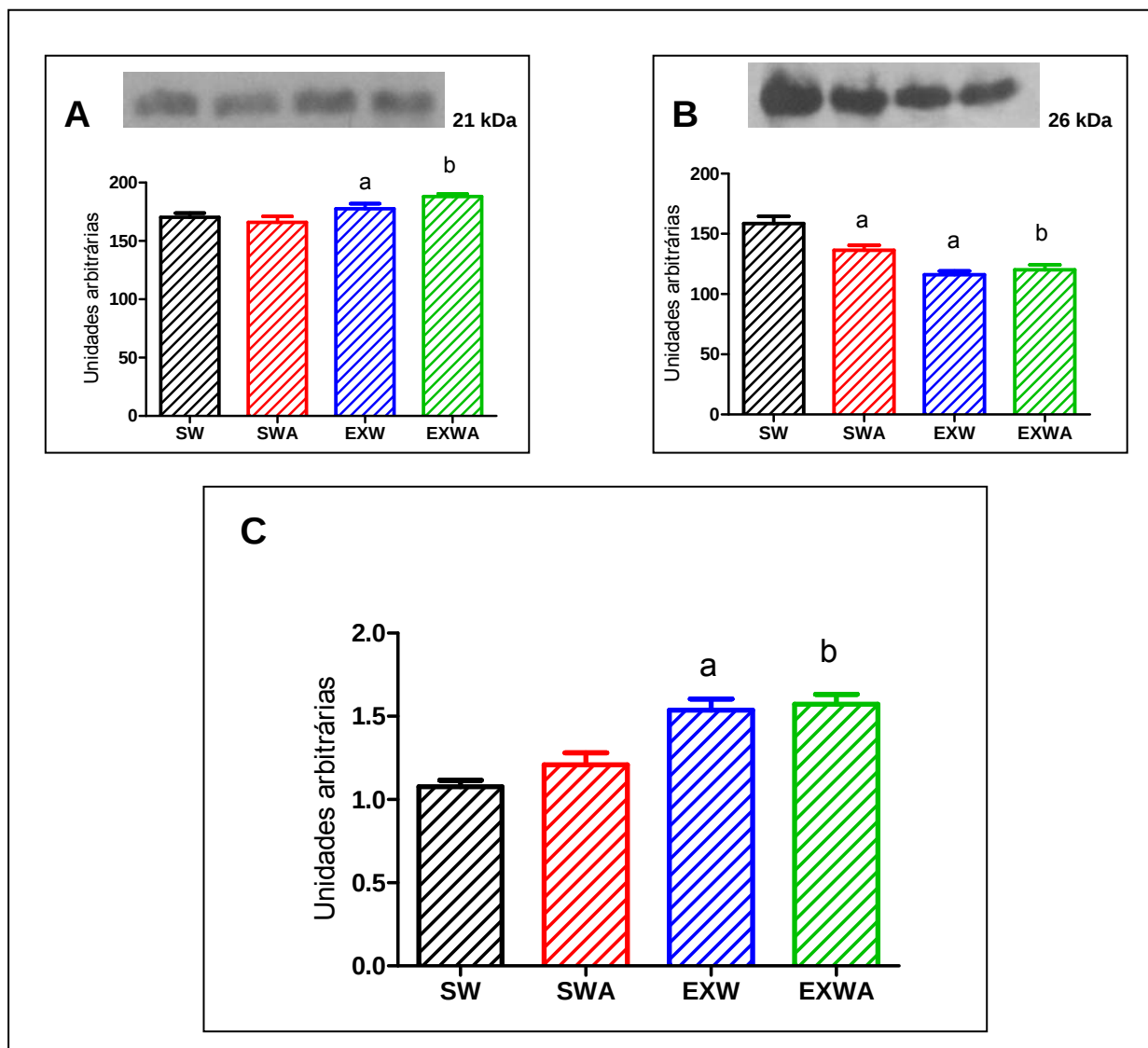


FIGURA 14: Expressão de Bax (A), Bcl-2 (B) em tecido tumoral e razão Bax/Bcl-2 (C) (unidades arbitrárias) dos animais dos grupos Sedentário portador de tumor (SW), Sedentário portador de tumor suplementado com óleo de fígado de tubarão (SWA), Exercitado portador de tumor (EXW) e Exercitado portador de tumor suplementado com óleo de fígado de tubarão (EXWA). Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM de unidades arbitrárias.

^a $p<0,05$ quando comparado ao grupo SW.

^b $p<0,05$ quando comparado ao grupo SWA e EXW.

5.2.6 Apoptose das células do tumor de Walker 256

A apoptose (%) das células tumorais marcadas com anexina-V foi de aproximadamente 7% no grupo SW. Tanto o exercício físico (EXW) quanto a suplementação com óleo de fígado de tubarão (SWA) aumentaram o número de células tumorais em apoptose (17% e 13%, respectivamente; $p < 0,05$ vs SW) e a associação das duas intervenções (EXWA) elevaram ainda mais a apoptose em cerca de 20% a qual foi significativamente maior quando comparada à do SW, EXW e SWA ($p < 0,05$).

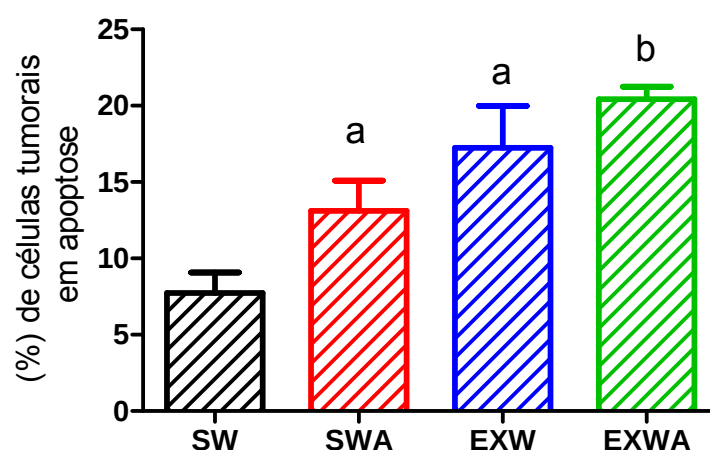


FIGURA 15: Apoptose (%) de células do tumor de Walker 256, dos grupos Sedentário portador de tumor (SW), Sedentário portador de tumor suplementado com óleo de fígado de tubarão (SWA), Exercitado portador de tumor (EXW) e Exercitado portador de tumor suplementado com óleo de fígado de tubarão (EXWA). Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM de quatro experimentos.

^a $p < 0,05$ quando comparado ao grupo SW.

^b $p < 0,05$ quando comparado ao grupo SWA e EXW.

6. DISCUSSÃO

A síndrome da caquexia está entre os aspectos mais debilitantes do indivíduo com câncer. Associada com anorexia, perda de tecido muscular e adiposo, angústia psicológica e baixa qualidade de vida, a caquexia surge de uma interação complexa entre o câncer e o anfitrião (INUÍ, 2002). O aparecimento de muitas doenças tem sido relacionado com o estilo de vida, dieta, tabagismo e sedentarismo. A prática de atividades físicas regulares e hábitos alimentares saudáveis são elementos significativos na prevenção e controle de alguns tipos de doenças (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2005). Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer estima que 25% das causas de câncer no mundo são consequência do sedentarismo, sobrepeso e obesidade (CAMPBELL & MCTIERNAM, 2007). A Faculdade Americana de Medicina e Esporte (ACSM, 2007) recomenda, pelo menos, 30 minutos de atividades físicas, com intensidade moderada, na maioria dos dias da semana. Para manutenção de condição saudável e independência física, também é necessário que uma pessoa adulta faça, pelo menos, duas vezes na semana, exercícios físicos que propiciem aumento ou manutenção dos níveis de massa muscular. Estudos relatando os benefícios proporcionados pela prática de atividades físicas têm aumentado gradativamente (FREDENREICH & ORENSTEIN, 2002).

O treinamento de força é caracterizado por exercícios resistidos onde o indivíduo realiza movimentos musculares contra uma força de oposição, como por exemplo, os exercícios com pesos (ACSM, 2002). Já o treinamento de endurance ou aeróbico consiste na realização de exercícios que, predominantemente, necessitam do oxigênio para a produção de energia, tais como corrida, ciclismo e natação. Estes exercícios são fundamentais para melhorar as capacidades pulmonar e cardiovascular (TAYLOR, et al. 2004). Os efeitos fisiológicos proporcionados pelo treinamento de força, são diferentes das adaptações provocadas pelo treinamento aeróbico. O treinamento de força aumenta a síntese protéica, resultando em aumento de proteínas contráteis, hipertrofia muscular (KRAEMER, et al. 1995), aumento da atividade das enzimas oxidativas musculares, elevação no número e tamanho, de mitocôndrias, vascularização e VO_2 máx (SPINA, et al. 1996). O treinamento aeróbico eleva tanto o número de capilares por fibra quanto o número

de capilares da área transversa do músculo exercitado, consequentemente, aumenta as trocas gasosas e a utilização de substratos pelo tecido muscular (MCCALL, et al. 1996). Dolezal & Potteiger (1998) demonstraram a influência positiva da associação do treinamento de força e aeróbico na redução do tecido adiposo e aumento do metabolismo basal. Em estudo realizado com atletas de “endurance”, Paavolainen et al. (1999) observaram melhora na performance em provas de 5 km após adicionarem, ao treinamento de “endurance”, sessões de treinamentos de força. Acredita-se que esta melhora se deve aos treinos de força resultarem em adaptações neuromusculares mais significativas que os treino de “endurance” isolado. Houve melhor solicitação e recrutamento das fibras musculares, bem como aumento nos impulsos excitatórios em relação aos inibitórios, promovendo assim aumento na performance durante a corrida, sem que fosse apresentada qualquer adaptação em relação à hipertrofia, limitando esse aumento às adaptações neurais. Millet et al. (2002) observaram economia do esforço nas provas de triatletas analisados, quando submetidos a um protocolo de treinamento de força. Neste estudo, foi possível verificar que os atletas que incluíram o treinamento de força em sua rotina conseguiram reduzir o gasto de energia, aumentaram massa muscular dos membros inferiores, além de maximizar o processo de contração da musculatura diretamente solicitada durante a corrida, melhorando assim a “performance”. Em estudo realizado por Milne et al. (2007), pacientes com câncer de mama em período de tratamento foram submetidos a um protocolo de treinamento, composto de exercícios aeróbicos e exercícios de força, durante 12 semanas. Nos grupos treinados observou-se menores níveis de fadiga e ansiedade, melhora da condição aeróbica, força muscular e qualidade de vida dos pacientes

Em outro estudo, ratos portadores de tumor com um treinamento de dez séries de saltos apresentaram cerca de 34% de redução do crescimento tumoral e atenuação de alguns sintomas da caquexia (LIMA, 2007). Em nosso estudo, ratos portadores do tumor de Walker-256, submetidos a um protocolo de treinamento que envolvia exercícios de natação e de saltos, apresentaram redução em 25% do crescimento tumoral, quando comparado aos ratos sedentários e sem suplementação (FIGURA 11). Os ratos sedentários que foram suplementados com óleo de fígado de tubarão, também apresentaram redução do crescimento tumoral

em aproximadamente 18%. Quando associamos o exercício físico com a suplementação com óleo de fígado de tubarão, encontramos valores percentuais ainda maiores, indicando efeito aditivo das duas intervenções na redução do desenvolvimento tumoral (FIGURA 11). Além de diminuir o crescimento tumoral, o exercício físico, a suplementação com óleo de fígado de tubarão e a associação de ambos, foram capazes de atenuar algumas mudanças metabólicas decorrentes da instalação da síndrome da caquexia (FIGURAS 8, 9 e 10). O estabelecimento da caquexia é caracterizado pela presença de hipoglicemia, hiperlaticidemia, hipertriacilglicerolemia, redução do conteúdo de glicogênio e perda de peso (PINTO et al., 2004). Tumores sólidos têm como característica, pobre provisão de sangue, consequentemente isto leva a grande produção de lactato e alto consumo de glicose, o qual se torna o substrato metabólico predominante (FOLADOR et al., 2006). O lactato produzido é utilizado pelo fígado como precursor para a gliconeogênese, sintetizando glicose, que será utilizada tanto pelo tumor quanto pelo hospedeiro (YONES & NOGUCHI, 2000). Todas estas características, exceto o conteúdo de glicogênio, não analisado neste trabalho, foram encontrados nos ratos portadores de tumor não submetidos ao treinamento ou a suplementação com óleo de fígado de tubarão (FIGURAS 1, 2 e 3). Outro componente importante relacionado à instalação da caquexia é a pronunciada perda de peso. A maior perda de peso observada foi no grupo sedentário portador de tumor (SW) quando comparada à dos demais grupos SWA, EXW e EXWA (TABELA 1), porém todos os grupos portadores de tumor tiveram perda de peso.

O óleo de fígado de tubarão é constituído de 30 a 50% por alquilgliceróis, gorduras formadas por uma cadeia hidrocarbônica, saturada ou insaturada, unida por ligação do tipo éter a uma das hidroxilas do glicerol. Ésteres lipídicos são substâncias químicas com pronunciada atividade biológica. A presença de grupo metóxi ($-OCH_3$), no início da cadeia alifática em substituição ao hidrogênio, confere estimulação da resposta imunológica e imunomodulação, atividade antifúngica, e em culturas de células demonstraram ter efeitos citotóxicos sobre células tumorais e redução de metástases (BROHULT et al., 1986). Estudos realizados com o alquilglicerol 1-O-(2-metóxi) hexadecilglicerol revelaram sua capacidade, em pequenas concentrações (μM), inibir a proliferação de células tumorais de próstata humanas (REYNOLDS et al., 2000). Tanto a suplementação com óleo de fígado de

tubarão (SWA) como o exercício físico (EXW) foram hábeis em atenuar a proliferação das células tumorais, *ex vivo*, e a associação do exercício físico com a suplementação óleo de fígado de tubarão diminuiu ainda mais a proliferação dessas células (FIGURA 12). Um possível mecanismo para explicar a menor taxa de proliferação celular no grupo sedentário suplementado com óleo de fígado de tubarão poderia ser pelo aumento da apoptose em células tumorais decorrente da maior produção lipoperoxidação. De fato, observamos um aumento na quantidade de células tumorais em apoptose (FIGURA 15), bem como na lipoperoxidação (FIGURA 13). Ácidos graxos poliinsaturados são mais suscetíveis à peroxidação lipídica, particularmente, por possuírem duas ou mais insaturações. Dentre os compostos presentes no óleo de fígado de tubarão encontramos em pequenas quantidades moléculas de ácidos graxos poliinsaturados n-3. Tumores obtidos de ratos portadores do tumor de Walker-256 suplementados com óleo de peixe, rico em ácidos graxos n-3, apresentaram maior peroxidação lipídica do que ratos não suplementados (MUND, 2007). Além da presença de n-3 no óleo de fígado de tubarão, os alquilglicerois encontrados em quantidades bem maiores também proporcionam condições para peroxidação lipídica. Estudo realizado por Diomedee et al. (1994), em pacientes com leucemia suplementados com alquilglicerois, relataram aumento do estresse oxidativo, sugerindo ser este um dos mecanismos possíveis para explicar o maior número de células em apoptose. De fato o grupo sedentário suplementado com óleo de fígado de tubarão apresentou 33% mais lipoperoxidação, mesmo resultado encontrado nos grupos EXW e EXWA (FIGURA 13). Tem sido mostrado que o exercício físico é capaz de induzir a peroxidação lipídica (GAGO-DOMINGUEZ et al., 2005), aumentar a peroxidação lipídica e a produção de radicais livres após a atividade física, em modelos animais e humanos (CLARKSON & THOMPSON, 2000 ; JILL, 1996). No metabolismo oxidativo, grande parte do oxigênio consumido é ligado ao hidrogênio durante o processo de fosforilação oxidativa, gerando água. No entanto, aproximadamente 4-5% do oxigênio consumido durante a respiração não é completamente reduzido à água, formando radicais livres. Durante o exercício físico, o consumo de oxigênio aumenta e em paralelo aumenta também a produção de radicais livres e a peroxidação lipídica (CLARKSON & THOMPSON, 2000). A produção de radicais livres e peroxidação

lipídica causada pelo exercício físico pode ser importante mecanismo contra o câncer (GAGO-DOMINGUEZ et al., 2005).

O exercício também demonstrou efeitos positivos em induzir a apoptose em células tumorais. O grupo exercitado EXW teve em torno de 50% mais células tumorais em apoptose que o grupo SW (FIGURA 15). Quando associamos o exercício físico com a suplementação com óleo de fígado de tubarão o número de células em apoptose foi 35% maior quando comparado ao grupo SWA. Isto nos permite sugerir que existe um efeito aditivo na apoptose de células tumorais quando associamos o exercício físico com a suplementação com óleo de fígado de tubarão. Outro possível mecanismo para explicar a menor taxa de proliferação celular nos grupos exercitados, seria que o exercício físico tem a capacidade de reduzir a proliferação de células tumorais juntamente com indução da apoptose (LEUNG et al., 2004). Isso parece acontecer pelo fato do exercício físico diminuir as concentrações de IGF-1 e aumentar as da proteína ligadora de IGF-1 (IGFBP-1) (TYMCHUK et al., 1998), reduzindo o estímulo de crescimento na célula tumoral. Mudança na concentração desta proteína pode aumentar o conteúdo da proteína p53 no tumor, a qual protege o genoma de mutações e alterações genéticas. Quando ocorrem erros no DNA, a p53 ativa genes ou fatores que causem a parada do ciclo celular ou a célula entra em apoptose a partir da transcrição de genes de proteínas pró-apoptóticas. O exercício físico tem sido cogitado como importante estratégia na intervenção contra o câncer, reduzindo o estímulo de proliferação juntamente com um aumento na apoptose em célula tumoral. O aumento nos níveis de p53 no tecido tumoral leva a um aumento da razão Bax/Bcl-2 (JIANG & WANG, 2000). A proteína Bcl-2 encontra-se ligada a membrana mitocondrial externa pela porção C-terminal, evitando o aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial. Ela o faz, provavelmente, por ligar-se e inibir outras proteínas pró-apoptóticas também da família Bcl-2, por exemplo, a Bax. O aumento da permeabilidade das membranas mitocondriais pode ocasionar o efluxo de proteínas mitocondriais e promover o início de uma cascata sinalizadora para a morte celular programada (KROEMER et al., 2007).

A proteína Bax atua como supressor tumoral, sua presença é essencial para apoptose em diferentes tipos celulares. Esta proteína exerce sua função dirigindo-se do citosol para a membrana mitocôndrial externa onde forma complexos

homooligoméricos com outros constituintes da família Bcl-2 (Bak) que dão origem a poros na membrana ou podendo ainda formar heterooligomeros com os constituintes do complexo do poro de transição de permeabilidade da membrana mitocondrial e também originar poros. Os poros formados promovem aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial e a liberação de proteínas do espaço intermembranas como, por exemplo, o citocromo C, que além, de ser uma proteína atua como uma lançadeira de elétrons no processo bioenergético mitocondrial, uma vez no citosol juntamente com o fator de indução de proteases apoptóticas 1 (APAF-1), forma o apoptossomo que promove a maturação proteolítica da caspase-9 e essa finalmente à ativação das caspases efetoras que levam ao fenótipo apoptótico (GODVADZE & ORRENIUS, 2006)

Resistência à apoptose é uma das principais características adquiridas pelas células tumorais (PERKINS, 2004). O exercício físico (EXW) e a associação do exercício físico com a suplementação com óleo de fígado de tubarão (EXWA) foram capazes de favorecer o balanço pró-apoptótico no ambiente tumoral, tanto por aumentar a expressão de Bax (FIGURA 14A) como diminuir Bcl-2 (FIGURA 14B). A suplementação com óleo de fígado de tubarão (SW) também foi hábil em diminuir Bcl-2 (FIGURA 14B), porém não alterou a expressão de Bax (FIGURA 14B). Visto isto, alterações na razão da expressão de Bax/Bcl-2 foram observadas somente nos grupos EXW e EXWA (FIGURA 14C). Isto nos mostra que a razão da expressão de Bax/Bcl-2 não é meramente uma relação matemática e outros mecanismos estão envolvidos nesse processo, uma vez que o ensaio de apoptose mostra que tanto a suplementação, como exercício físico e associação das duas intervenções aumentaram significativamente o percentual de células tumorais em apoptose (FIGURA 15).

7. CONCLUSÃO

- O exercício físico e a suplementação com óleo de fígado de tubarão, isoladamente, reduziram a massa tumoral, proliferação das células tumorais e atenuaram a instalação da caquexia.
- A associação do exercício físico com a suplementação com óleo de fígado de tubarão causou efeito aditivo reduzindo ainda mais o crescimento e proliferação das células tumorais.
- O exercício físico e a suplementação, isoladamente, ainda aumentaram o percentual de células tumorais em apoptose, levaram a aumento da lipoperoxidação, aumento da expressão de Bax e redução de Bcl-2, favorecendo balanço pró-apoptótico no ambiente tumoral.
- A associação do exercício físico com a suplementação proporcionou também efeito aditivo no aumento da apoptose de células tumorais.
- Estes resultados corroboram a hipótese de que o exercício físico e a suplementação com óleo de fígado de tubarão possuem papéis importantes no auxílio do tratamento de indivíduos portadores de tumor e evidenciam que a associação destas intervenções resulta em benefícios ainda maiores.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

American College of Sports Medicine (ACSM). Physical Activity and Public Health: Updated Recommendation for Adults from the American College of Sports Medicine and the American Heart Association. **Special Reports**, 1423-1434, 2007.

American College of Sports Medicine (ACSM). Position stand. Progression models in resistance training for healthy adults. **Med Sci Sports Exerc.** 34: 364–380, 2002.

ALBRIGHT, A.; FRANZ, M.; HORNSBY, G. American College of Sports Medicine position stand. Exercise and type 2 diabetes. **Med Sci Sports Exerc.** 32: 1345–1360, 2000.

AL-MAJID, S.; MCCARTHY, D.O. Cancer-induced fatigue and skeletal muscle wasting: The role of exercise. **Biolog. Res. Nurs.** 2(3): 186-197, 2001a.

AL-MAJID, S.; MCCARTHY, D.O. Resistance exercise attenuates wasting of the Extensor Digitorum Longus Muscle in mice bearing the Colon-26 Adenocarcinoma. **Biolog. Res. Nurs.** 2(3):155-166, 2001b.

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

ARGILÉS, J.M.; COSTELLI, P.; CARBO, N.; PALLERES-TRUJILLO, J.; LOPESSORIANO, F.J. Tumor growth and nitrogen metabolism in host. **Inst. J. Oncol.** 14(3):479-86, 1999.

ARGILÉS, J.M.; LOPEZ-SORIANO, F.J. The role of cytokines in cancer cachexia. **Med. Res. Rev.** 19:223-248, 1999.

ARGILÉS, J.M.; BUSQUETS, S.; LOPES-SORIANO, F.J. The pivotal role of cytokines in muscle wasting during cancer. **The Int. J. of Biochemistry & Cell Biology.** 37: 2036–2046, 2005.

ATTAIX, D.; TAILLANDIER, D.; COMBARET, L. Expression of subunits of the 19S complex and of the PA28 activator in rat skeletal muscle. **Mol Biol Rep.** 24:95–98, 1997.

BARACOS, V.E. Exercise inhibits progressive growth of the Morris hepatoma in male and female rats. **Can. J. Physiology. Pharmacology.** 67:864-870, 1989.

BIOLO, G.; BOSULTI, A.; ISCARA, F. Contribution of the ubiquitin-proteasome pathway to overall muscle proteolysis in hypercatabolic patients. **Metabolism.** 49:689–691, 2000.

BODINE, SC.; LATRES, E.; BAUMHUETER, S. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. **Science.** 294:1704–1708, 2001.

BRAITH, R.W.; WELSCH, MA.; MILLS R.M.; KELLER, J.W.; POLLOCK, M.L. Resistance exercise prevents glucocorticoid-induced myopathy in heart transplant recipients. **Med Sci Sports Exercise**. 30:483-489, 1998.

BROHULT, A.; BROHULT, J.; BROHULT, S. JOELSSON, I. Reduced mortality in cancer patients after administration of alkoxyglycerols. **Acta Obstet Gynecol Scand**. 65: 779-785, 1986.

BROHULT, A.; BROHULT, J.; BROHULT, S. JOELSSON, I. Effect of alkoxyglycerols on the frequency of injuries following radiation therapy for carcinoma of the uterine cervix. **Acta Obstet Gynecol Scand**. 56: 441-448, 1977.

BROHULT, A. Alkoxyglycerol-esters in irradiation treatment. **Nature**. 193: 4822, 1962.

BURNHAM, T.R.; WILCOX, A. Effects of exercise on physiological and psychological variables in cancer survivors. **Medicine and Science in Sports Exercise**. 34: 1863-1867, 2002.

CALDER, P.C. N-3 Polyunsaturated fatty acids and mononuclear phagocyte function. **In: Medicinal Fatty Acids in Inflammation**. Edited by J. Kremer, Birkhauser Verlag, Basel (Switzerland): 1-27, 1998.

CAMPBELL,K.; MCTIERNAN,A. Exercise and biomarkers for cancer prevention studies. **Journal of Nutrition**. 137:161-169, 2007.

CAO, Z.; MATTISON,J.; ZHAO, Y.; JOKI, N.; GRASSO, M.; CHANG, N. Regulation of tumor necrosis factor- and fas-mediated apoptotic cell death a novel cDNA. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 227: 266-272, 1996.

CLARKSON, P.M; THOMPSON, H.S. Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? **Am J Clin Nutr**. 72: 637S–646S, 2000.

COURNEYA K. & FRIEDENREICH C.M. Relationship between exercise pattern across the cancer experience and current quality of life in colorectal cancer survivors. **Journal of Alternative and Complementary Medicine**. 3: 215–226, 1997.

DANERYD, P.; HAFSTRÖM, L.; SVANBERG, E.; KARLBERG, I. Insulin sensitivity, hormonal levels and skeletal muscle protein metabolism in tumor-bearing exercising rats. **European Journal of Cancer**. 31: 97-103, 1995.

DIMEO, F.C. Effects of Exercise on Cancer-Related Fatigue. **American Cancer Society**. 92: 1689-1693, 2001.

DIMEO, F.; TILMANN, M.H.; BERTZ, H.; KANZ, L.; MERTELSMANN, R.; KEUL, J. Aerobic exercise in the rehabilitation of cancer patients after high dose chemotherapy and autologous peripheral stem cell transplantation. **Cancer**. 79: 1717–1722, 1997.

DIMEO, F.; BERTZ, H.; FINKE, J.; FETSCHER, S.; MERTELSMANN, R.; KEUL, J. An aerobic exercise program for patients with haematological malignancies after bone marrow transplantation. **Bone Marrow Transplant.** 18:1157–60, 1996.

DIOMEDE, L; PIOVANI, B; RE, F. The induction of apoptosis is a common feature of the cytotoxic action of ether-linked glycerophospholipids in human leukemic cells. **Int J Cancer.** 57: 645-649, 1994.

DOLEZAL, B.A., and POTTEIGER, J.A. Concurrent resistance and endurance training influence basal metabolic rate in nondieting individuals. **J. Appl. Physiol.** 85(2): 695–700, 1998.

DOMMELS, Y. E. M.; ALINK, G. M.; BLADEREN, P. J.; OMMEN, B. Dietary n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids and colorectal carcinogenesis: results from cultured colon cells, animal models and human studies. **Environmental Toxicology and Pharmacology.**12: 233-244, 2002.

DUNLOP, R.J.; CAMPBELL, C.W. Cytokines and advanced cancer. **Journal of Pain and Symptom Management.** 3: 214-232, 2000.

EDEN, E.; EDSTROM, S.; BENNEGARD, K.; SCHERSTEN, T.; LUNDHOLM, K. Glucose flux in relation to energy expenditure in malnourished in patients with and without cancer during periods of fasting and feeding. **Cancer Res.** 44:1718-1724, 1984.

ENGLE, P.C.; JONES, J.B. Causes and elimination of erratic blanks in enzymatic metabolite assays involving the use of NAD⁺ in alkaline hydrazine buffers: improved conditions for the assay of L-glutamate, L-lactate, and other metabolites. **Analytical Biochemistry.** 88: 475-484, 1978.

EVANS, W.J.; ROUBENOFF, R.; SHEVITZ, A. Exercise and the treatment of wasting: aging and human immunodeficiency virus infection. **Semin. Oncol.** 25(suppl 6):112-122, 1998.

FEARON, K.C.H. The mechanisms and treatment of weight loss in cancer. **Proceedings of the Nutrition Society.** 2: 98, 1992.

FERRANDO, A.A.; TIPTON, K.D.; BAMMAN, N.M.; WOLFE, R.R. Resistance exercise maintains skeletal muscle protein synthesis during bed rest. **J. Appl. Physiol.** 82: 807-810, 1997.

FOLADOR, A.; HIRABARA, S.M.; BONATTO, S.J.R.; AIKAWA, J.; YAMAZAKI, R.K.; CURI, R.; FERNANES, L.C. Effect of fish oil supplementation for 2 generations on changes in macrophage function induced by Walker 256 cancer cachexia in rats. **Int. J. Cancer** 120: 344–350, 2006.

FREDENREICH, C.M; ORENSTEIN, M.R. Physical Activity and Cancer Prevention: Etiologic Evidence and Biological Mechanisms. **J. Nutr.** 132: 3456S–3464S, 2002

GAGO-DOMINGUEZ, M.; CASTELAO, J.; PIKE, M.C.; SEVANIAN, A.; HAILE, R.W. Role of lipid peroxidation in the epidemiology and prevention of breast cancer. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, 14: 2829–39, 2005.

GREIWE, J.S.; CHENG, B.; RUBIN, D.C.; YARASHESKI, K.E.; SEMENKOVICH, C.F. Resistance exercise decreases skeletal muscle tumor necrosis factor in frail elderly humans. **FASEB J.** 15: 475-482, 2001.

HASSELGREN, P.O.; FISCHER, J.E. Muscle cachexia: current concepts of intracellular mechanisms and molecular regulation. **Ann Surg**, 233: 9–17, 2001.

HESPEL, P.; OP'T EIJNDE, B.; VAN LEEMPUTTE, M.; URSO, B.; GREENHAFF, P. L.; LABARQUE, V.; DYMARKOWSKI, S.; VAN HECKE, P.; RICHTER, E. A. Oral creatine supplementation facilitates the rehabilitation of disuse atrophy and alters the expression of muscle myogenic factors in humans. **Journal of Physiology**. 536.2: 625-633, 2001.

HOLLOSZY, J.O.; COYLE, E.F. Adaptations of skeletal muscle to endurance exercise and their metabolic consequences. **J. Appl. Physiol.** 56: 831-838, 1984.

HUERTA, S.; GOULET, E.J.; LIVINGSTON, E.H.; et.al. Colon cancer and apoptosis. **The American Journal of Surgery**. 191: 517-526, 2006.

INUI, A. Cancer Anorexia-Cachexia Syndrome: Current Issues in Research and Management A Cancer Journal for Clinicians. **Can Jour for Clin.** 52: 72-91, 2002.

JAKICIC, J.; CLARK, K.; COLEMAN, E. American College of Sports Medicine position stand. Appropriate intervention strategies for weight loss and prevention of weight regain for adults. **Med Sci Sports Exerc.** 33: 2145–2156, 2001.

JIANG, X.; WANG, X. Cytochrome c promotes caspase-9 activation by inducing nucleotide binding to Apaf-1. **J. Biol. Chem.** 275: 31199-31203, 2000.

JILL. Exercise, oxidative stress, and antioxidants. **Am J Sports Med.** 24: S20–4, 1996.

JURIMAE, J.; ABERNETHY, P.J.; BLAKE, K.; McENIERY, M.T. Changes in the myosin heavy chain isoform profile of the triceps brachial muscle following 12 weeks of resistance exercise training. **Eur. J. Physiol.** 74: 287-292, 1996.

KRAEMER, W.J., PATTON, J.F., GORDON, S.E., HARMAN, E.A., DESCHENES, M.R., REYNOLDS, K., NEWTON, R.U., TRIPLETT, N.T. and DZIADOS, J.E. Compatibility of high intensity strength and endurance training on hormonal and skeletal muscle adaptations. **J. Appl. Physiol.** 78(3): 976-989, 1995.

KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; BRENNER, C. Mitochondrial Membrane Permeabilization In Cell Death. **Physiol. Rev.** 87:99-163, 2007.

KROTKIEWSKI, M.; PRZYBYSZEWSKA, M. JANIK, P. Cytostatic and cytotoxic effects of alkylglycerols (Ecomer). **Med Sci Monit.** 9(11): 131-135, 2003.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature, London** 227: 680-685, 1970.

LAUBER, K.; APELL, H.A.E.; SCHLOSSER, S.F.; GREGOR, M.; OSTHOFF, K.S.; WESSELBORG, S. The Adapter Protein Apoptotic Protease-activating Factor-1 (Apaf-1) Is Proteolytically Processed during apoptosis. **The Journal of Biological Chemistry.** 32: 29772 – 29781, 2001.

LEUNG, W.K. Association between cyclo-oxygenase-2 overexpression and missense p53 mutations in gastric cancer. **J. Cancer.** 84: 335–339, 2001.

LIMA, C. Efeito da suplementação com glutamina associada ao treinamento de salto sobre o crescimento tumoral, caquexia e proliferação de linfócitos t em ratos portadores de tumor de walker 256 - Identificação dos mediadores participantes neste processo. **Dissertação de Mestrado.** UFPR, Curitiba/PR, 2007.

LINDERMAN, J.K.; GOSSELINK, K.L.; BOOTH, F.W.; MUKKU, V.R.; RINDELAND, R.E. Resistance exercise and growth hormone as counter-measures for skeletal muscle atrophy in hind limb-suspended rats. **Am. J. Physiol.** 267: R365-R371, 1994.

LORITE, M.J.; THOMPSON, M.G; DRAKE, J.L.; CARLING, G.; TISDALE, M.J. Mechanism of muscle protein degradation induced by a cancer cachectic factor. **Br. J. Cancer.** 78: 850-856, 1998.

LUCIA, A.; EARNEST, C.; PEREZ, M. Cancer-related fatigue: can exercise physiology assist oncologists? **Lancet Oncol.** 4: 616–625, 2003.

MACDONALD, N.; EASSON, A.M.; MAZURAK, V.C.; DUNN, G.P.; BARACOS, V.E. Understanding and managing cancer cachexia. **J Am Coll Surg.** 197: 143-161, 2003.

MACVICAR, M.G.; WINNINGHAM, M.L.; NICKEL, J.L. Effects of aerobic interval training on cancer patients' functional capacity. **Nursing Research.** 38: 348–351, 1989.

MARWICK, C. Natural compounds show antiangiogenic activity. **Journal of the National Cancer Institute.** 93(22): 1685, November 21, 2001.

MCCALL, G.E., BYRNES, W.C., DICKINSON, A., PATTANY, P.M. and FLECK, S.J. Muscle fiber hypertrophy, hyperplasia, and capillary density in college men after resistance training. **J. Appl. Physiol.** 81(5): 2004–2012, 1996

MCENTEE, M.F. and WHELAN, J. Dietary polyunsaturated fatty acids and colorectal neoplasia. **Biomed Pharmacother.** 56: 380-387, 2002.

MILLET, G.P.; JAOUEN, B.; BORRANI, F. and CANDAU, R. Effects of concurrent endurance and strength training on running economy and VO₂ kinetics. **Med. Sci. Sports Exerc.** 34(8): 1351–1359, 2002.

MILNE, H.M.; WALLMAN, K.E.; GORDON, S.; COURNEYA, K.S. Effects of a combined aerobic exercise program in breast cancer survivors: a randomized controlled trial. **Breast cancer res treat**, 2007.

MUND, R. C. Suplementação crônica com óleo de peixe reduz a taxa de crescimento do tumor de Walker 256. Identificação dos mediadores participantes neste processo. 2004. **Dissertação de mestrado**. UFPR: Setor de Ciências Biológicas, Curitiba/PR, 2004.

NICHOLSON D.W.; THORNBERRY, N.A. Caspases: killer proteases. **Trends Biochem Sci** 22: 299–306, 1997.

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

NOUROOZ-ZADEH, J.; SARMADI-TAJADDINI, J.; WOLFF, S.P. Measurement of plasma hydroperoxide concentrations by de ferrous oxidation-xylenol orange assay in conjunction with tryphenylphosphine. **Analytical biochemistry**. 220: 403-409, 1994.

NUNES, E. A. Efeito do treinamento de saltos e da suplementação com β -hidróxi- β -metilbutirato (HMB) sobre o crescimento tumoral, caquexia e parâmetros imunitários de ratos portadores do tumor de Walker 256. **Tese de Mestrado**, UFPR, Paraná, 2005.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Disponível em: <http://www.opas.org.br>. Acesso em: fevereiro de 2007.

PAAVOLAINEN, L.; HAKKINEN, K.; HAMALAINEN, I.; NUMMELA, A. and RUSKO, H. Explosive strength training improves 5-km running time by improving running economy and muscle power. **J. Appl. Physiol.** 86(5): 1527–1533, 1999.

PERKINS, N. D. NF-KB: tumor promoter or suppressor? **Trends Cell Biol.** 14; 64 - 69, 2004.

PESCATELLO, L.; FRANKLIN, B.A.; FAGARD, R.; FARQUHAR, W.B.; KELLEY, G.A.; RAY, C.A. American College of Sports Medicine. Exercise and hypertension. **Med Sci Sports Exerc.** 36: 533–553, 2004.

PINTO, J. A. JR; FOLADOR, A.; BONATO, S. J.; AIKAWA, J.; YAMAZAKI, R. K.; PIZATO, N.; FACIN, M.; GROHS, H.; DE OLIVEIRA, H. H.; NALIWAIKO, K.; FERRAZ, A. C.; NISHIYAMA, A.; FERNANDEZ, R.; CURI, R.; FERNANDES, L. C. Fish oil supplementation in F1 generation associated with naproxen, clenbuterol, and insulin administration reduce tumor growth and cachexia in Walker 256 tumorbearing rats. **Journal of Nutrition Biochemistry**. 15: 358-65, 2004.

POWERS, S.K.; HOWLEY, E.T. **Fisiologia do Exercício, Teoria e Aplicação ao Condicionamento e ao Desempenho**. 1ª ed., Manole: Barueri-SP, 527, 2000.

RAJAPUROHITAM, V.; BEDARD, N.; WING, S.S. Control of ubiquitination of proteins in rat tissues by ubiquitin conjugating enzymes and isopeptidases. **Am J Physiol**, 282: E739–745, 2002.

REYNOLDS, S.; CEDERBERG, H.; CHAKRABARTY, S. Inhibitory effect of 1-O(2 methoxy) hexadecyl glycerol and phenylbutyrate on the malignant properties of human prostate cancer cells. **Clinical & Experimental Metastasis**. 18; 309-312, 2000.

ROBERGS, R.A.; ROBERTS, S.O. **Princípios Fundamentais de Fisiologia do Exercício para a aptidão, desempenho e saúde**. 1ª ed., Phorte editora: São Paulo-SP, 489, 2002.

ROSE, D.P.; CONNOLLY, J.M. Omega-3 fatty acids as cancer chemopreventive agents. **Pharmacology & Therapeutics**. 83: 217-244, 1999.

SATTLER, F.R.; JAQUE, V.; SCHROEDER, T. ; OLSON, C.; DUBE, M.P.; MARTINEZ, C.; BRIGGS, L.; HORTON, R.; AZEN, S. Effects of pharmacological doses of nandrolone decanoate and progressive resistance training in immune deficient patients infected with human immunodeficiency virus. **J. Clin. Endocrinol Metab**. 84: 1268-1276, 1999.

SCHILLER, J.H.; BITTNER, G. Potentiation of platinum antitumor effects in human lung tumor xenografts by the angiogenesis inhibitor squalamine: effects on tumor neovascularization. **Clinical Cancer Research**. 5: 4287-4294, 1999.

SEELAENDER, M. C. L. **Metabolismo de lipídeos em ratos portadores do tumor de Walker 256**: avaliação da atividade do sistema carnitina palmitoil transferase mitocondrial hepático. São Paulo, 1994. 122p. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo.

SEGAL, R.; EVANS, W.; JOHNSON, D.; SMITH, J.; COLLETTA, S.; GAYTON, J.; WOODARD, S.; WELLS, G.; REID, R. Structured exercise improves physical functioning in women with stages I and II breast cancer: results of a randomized controlled trial. **Journal of Clinical Oncology**. 19: 657–665, 2001.

SEGAL, R.J.; REID, R.D.; COURNEYA, K.S. Resistance exercise in men receiving androgen deprivation therapy for prostate cancer. **J Clin Oncol**. 21: 1651-1652, 2003.

SILLS JR, A.K.; WILLIAMS, J.I.; TYLER, B.M.; EPSTEIN, D.S.; SIPOS, E.P.; DAVIS, J.D.; MCLANE, M.P.; PITCHFORD, S.; CHESHIRE, K.; GANNON, F.H.; KINNEY, W.A.; CHAO, T.L.; DONOWITZ, M.; LATERRA, J.; ZASLOFF, M.; BREM, H. Squalamine inhibits angiogenesis and solid tumor growth in vivo and perturbs embryonic vasculature. **Cancer Research**. 58: 2784-2792, 1998.

SIMPOULOS, A.P. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. 00, 2002.

SPINA, R.J.; CHI, M.M.Y.; HOPKINS, M.G.; NEMETH, P.M.; LOWRY, O.H.; HOLLOSZY, J.O. Mitochondrial enzymes increase in muscle in response to 7-10 days of cycle exercise. **J. Appl. Physiol.** 80: 2250-2254, 1996.

STEVINSON, C.; FOX, K. Role of exercise for cancer rehabilitation in UK hospitals: a survey of oncology nurses. **Eur J Cancer Care (in press)**, 2004.

STORY, M.; KODYM, R. Signal transduction during apoptosis; implications for cancer therapy. **Front Biosci.** 3: d365-375, 1998.

TAMAKI, T.; SHUICHI, U.; NAKANO, S. A weight-lifting exercise model for inducing hypertrophy in the hind limb muscles of rats. **Med. Sci. Sports Exerc.** 24: 881-886, 1992.

TANAKA, K. Molecular biology of the proteasome. **Biochem Biophys Res Commun.** 247: 537-541, 1998.

TAYLOR, S.R.; BROWN, A.; EBRAHIN, S.; JOLLIFFE, J.; NOORANI, H.; RESS, K.; SKIDMORE, B.; STONE, J.A.; THOMPSON, D.R.; OLDRIDGE, N. Exercise-based rehabilitation for patients with coronary heart disease: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **The American Journal of Medicine** 116: 682-692, 2004.

TEICHER, B.A.; WILLIAMS, J.I.; TAKEUCHI, H.; ARA, G.; HERBST, R.S.; BUXTON, M.A. Potencial of aminosterol, squalamine in combination therapy in the rat 13,762 mammary carcinoma and the murine Lewis lung carcinoma. **Anticancer Research.** 18: 2567-2573, 1998.

THORNBERRY, N.A.; LAZEBNIK, Y. Caspases: enemies within. *Science* 281:1312-1316, 1998.

TISDALE, M, J. Pathogenesis of cancer cachexia. **The journal supportive oncology.** 1: 159-168, 2003.

TISDALE, M.J. Protein loss in cancer cachexia. **Science**, 289: 2293-2295, 2000.

TISDALE, M. J. Cancer anorexia and cachexia. **Nutrition**,17: 438-442, 2001.

TISDALE, M.J. Molecular Pathways Leading to Cancer Cachexia. *Physiology* 20: 340-348, 2005.

TYMCHUK CN, TESSLER SB, ARONSON WJ, AND BARNARD RJ. Effects of diet and exercise on insulin, sex hormone-binding globulin, and prostatespecific antigen. **Nutr. Cancer** 31: 127-131, 1998.

VERMEULEN, K.; BERNEMAN, Z. N.; VAN BOCKSTAELE, D. R. Cell cycle and apoptosis. **Cell Prolif.**, 36: 165-175, 2003.

VILLUNGER, A.; STRASSER, A. Does death receptor signaling play a role in tumorigenesis and cancer therapy? **Oncol Res.** 10 (11-12): 541-550, 1998.

VUORI, I. Dose-response of physical activity and low back pain, osteoarthritis, and osteoporosis. **Med Sci Sports Exerc** 33: S551–S586, 2001.

WAGNER, G.; RABKIN, J.; RABKIN, R. Exercise as a mediator of psychological and nutritional effects of testosterone therapy in HIV+ men. **Med. Sci. Sports Exerc.** 30: 811-817, 1998.

WILLIAMS, A.; SUN, X.; FISCHER, J.E. The expression of genes in the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway is increased in skeletal muscle from patients with cancer. **Surgery**, 126: 744–750, 1999.

WILLIAMS, C.S.; DUBOIS, R.N. The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development, **Oncogene**. 18: 7908–7916, 1998.

WILLIAMS, C.S.; DUBOIS, R.N. Prostaglandin endoperoxide synthase: why two isoforms?. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**. 270: 393-400, 1996.

WILLIAMS, J.I.; WEITMAN, S.; GONZALEZ, C.M.; JUNDT, C.H.; MARTY, J.; STRINGER, S.D.; HOLROYD, K.J.; MCLANE, M.P.; CHEN, Q.; ZASLOFF, M.; VON HOFF, D.D. Squalamine treatment of human tumors in nu/ni mice enhances platinum-based chemotherapies. **Clinical Cancer Research**. 7: 724-733, 2001.

WILMORE, J. K.; COSTILL, D. L. **Fisiologia do Esporte e do Exercício**. 1ª ed., Manole, Barueri-SP, 709, 2001.

WINNINGHAM M.L.; MACVICAR M.G. The effect of aerobic exercise on patient reports of nausea. **Oncology Nursing Forum**. 15: 447–450, 1988.

YAMAMOTO, K.; ICHIJO, H.; KORSMEYER, S. J. Bcl-2 is phosphorylated and inactivated by an ASK1/Jun N-terminal protein kinase pathway normally activated at G(2)/M. **Mol. Cell. Biol**. 9: 8469-8478, 1999.

YARASHESKI, K.E.; PAK-LODUCA, J.; HASTEN, D.L.; OBERT, K.A.; BROWN, M.B.; SINACORE, D.R. Resistance exercise training increases mixed muscle protein synthesis rate in frail women and men > or = 76 yr old. **Am. J. Physiol**. 277 (1 pt 1): E118-E125, 1999.

YOUNES, R, N.; NOGUCHI, Y.; Pathophysiology of câncer cachexia. **Revista Hospital de Clinicas da Faculdade de Medicina de São Paulo**. set/out , 191-193, 2000.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)