

**CRISTINA PESSINI**

**EFEITOS DA ASSOCIAÇÃO DE EXERCÍCIO FÍSICO E  
SUPLEMENTAÇÃO COM  $\beta$ -HIDROXI- $\beta$ -  
METILBUTIRATO (HMB) SOBRE CRESCIMENTO  
TUMORAL E CAQUEXIA EM RATOS PORTADORES  
DE TUMOR**

Dissertação de Mestrado defendida como pré-requisito para a obtenção do título de Mestre em Educação Física, no Departamento de Educação Física, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

**CRISTINA PESSINI**

**EFEITOS DA ASSOCIAÇÃO DE EXERCÍCIO FÍSICO E  
SUPLEMENTAÇÃO COM  $\beta$ -HIDROXI- $\beta$ -  
METILBUTIRATO (HMB) SOBRE CRESCIMENTO  
TUMORAL E CAQUEXIA EM RATOS PORTADORES DE  
TUMOR**

Dissertação de Mestrado defendida como pré-requisito para a obtenção do título de Mestre em Educação Física, no Departamento de Educação Física, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Cláudio Fernandes

*“Eis o meu segredo. É muito simples: só  
se vê bem com o coração. O essencial é  
invisível para os olhos.”*

*(Antoine de Saint-Exupéry)*

## **AGRADECIMENTOS**

Para mim, mais importante que a conclusão deste estudo, são os conhecimentos conquistados e os ensinamentos para a minha vida adquiridos. E para isso muitas pessoas foram importantes:

Teresinha e José, meus pais, e Marcelo, meu irmão, obrigada por me apoiarem na busca dos meus sonhos e objetivos e, pelo exemplo de humildade e honestidade. E obrigada à Magali, por fazer meu irmão feliz.

Luiz Cláudio Fernandes, meu orientador, obrigada pelos conselhos, pela oportunidade de trabalhar neste laboratório, por me ensinar tantas coisas sempre com paciência, entendendo meu limite.

Katya, sempre sorrindo e pronta para ajudar a qualquer momento, muito obrigada por me ajudar nos experimentos de histoquímica que, por minha culpa, não deram certo. “Antes tentar e errar, do que carregar para sempre a culpa de não ter tentado. “

Raul Osiecki, talvez você nem faça idéia de que foi por sua culpa que isso tudo começou. Em seu laboratório, eu conheci o maravilhoso mundo da fisiologia, e você que me incentivou a continuar meus estudos e tentar o mestrado. Muito obrigada!

Diogo, obrigada pela parceria durante os treinamentos dos ratos, suplementação dos animais aos finais de semana, pela paciência com meus defeitos pessoais e com meu jeito “câmera lenta” de viver a vida, fiz o melhor que pude. Obrigada por me explicar tantas coisas, cálculos, vias de sinalização e etc. É um exemplo raro do conjunto inteligência, beleza e bom caráter. Mica, obrigada por fazer o Diogo feliz.

Luciéle, mulher de Guerra, Minuzzi. Amiga querida. Admiro muito você. Obrigada pelos conselhos, viagens, congressos, praias, cervejas, baladas. Obrigada por sua amizade.

Carine, conselheira e amiga, obrigada pelas palavras de conforto nos momentos de baixa auto-estima, e por me passar valiosos conhecimentos.

Everson, meu amigo enciclopédia ambulante, admiro demais sua capacidade de explicar, de ensinar. Obrigada por me fazer acreditar mais em mim mesma e por ter me ensinado tanta coisa com paciência quando cheguei ao laboratório sem noção de nada.

Paaaaulo, obrigada pelos abraços e risadas, fazendo das longas horas no laboratório momentos felizes.

Luciana e Carina, lindas e queridas. Obrigada pelos auxílios nos experimentos. Temos que marcar uma “queda”, isso não pode virar lenda, vai ser muito bom dar umas risadas com vocês no mar.

Lóli, Andressa (maizena), Ana Lúcia, Fabíola, Fernanda, Gleisson, Sandrinho, Luis Alexandre (por me ensinar a fazer café), Sérgio, Isabela, Márcio, Helô, Dalva, Pedro,

Jaisson e Marcelo, colegas de laboratório, pessoas que me ajudaram muito nos meus experimentos e que com certeza deixaram mais do que somente um rastro na minha vida. Sempre vou me lembrar com carinho.

Aos bioteristas e funcionários da UFPR.

Beta, Marco, Marcelo, Hashi, Karin, Vika, Leys e muitos outros amigos que me ajudaram muito neste período e compreenderam minha ausência.

**E agradeço imensamente a Deus pela minha vida, e rezo para que faça estas pessoas felizes.**

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	iv
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	v
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	v
<b>RESUMO</b> .....	vi
<b>1.0 INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1 Câncer	2
1.2 Caquexia	2
1.3 Tumor de Walker 256	5
1.4 Degradação do tecido muscular	6
1.5 Treinamento de força e câncer	10
1.6 $\beta$ -Hidroxi- $\beta$ -Metilbutirato (HMB)	12
1.7 HMB e câncer	15
<b>2.0 OBJETIVOS</b> .....	17
<b>3.0 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	17
3.1 Animais	17
3.2 Suplementação	17
3.3 Treinamento	18
3.4 Inoculação do tumor	18
3.5 Pesagem corporal e tumoral	19
3.6 Ortotanásia dos animais	19
3.7 Mensuração do lactato	19
3.8 Mensuração da glicemia	19
3.9 Mensuração do conteúdo de glicogênio hepático	19
3.10 Mensuração do triacilglicerol plasmático (TAGs)	20
3.11 Peroxidação lipídica	20
3.12 Quantificação das proteínas para peroxidação lipídica	21
3.13 Tratamento Estatístico	21
<b>4.0 RESULTADOS</b> .....	23
4.1 Massa dos tumores	23
4.2 Glicemia	24
4.3 Lactato	26
4.4 Conteúdo de glicogênio hepático	28
4.5 Triacilglicerol	30
4.6 Peroxidação lipídica	32

<b>5.0 DISCUSSÃO .....</b>	<b>34</b>
<b>6.0 CONCLUSÃO.....</b>	<b>44</b>
<b>7.0 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>45</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

- AIDS: Síndrome da imunodeficiência adquirida  
AMPc: adenosina monofosfato cíclica  
ATP: Adenosina trifosfato  
COX: ciclooxigenase  
EDL: Músculo extensor longo do dedo  
EPA: Ácido Eicosapentaenóico  
EPM: erro padrão da média  
GLUT-4: transportador de glicose -4  
HDL: Lipoproteína de alta densidade  
HMB:  $\beta$ -hidroxi- $\beta$ -metilbutirato  
IFN  $\gamma$ : interferon gama  
IGF-I: Fator de crescimento parecido com a insulina - I  
IL: Interleucina  
KIC:  $\alpha$ -cetoisocaproato  
LDh: Lactato desidrogenase  
LDL: Lipoproteína de baixa densidade  
LMF: fator de mobilização lipídica  
NADPH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma reduzida, oxidase  
NF-kB: Fator Nuclear kB  
PBS: Tampão fosfato salina  
PG: Prostaglandina  
PIF: Fator Indutor de Proteólise  
PKC: proteína quinase C  
PMN: Células polimorfonucleares sanguíneas  
TAG: Triacilglicerol  
TCA: Ácido tricloroacético  
TEA: Trietanolamina  
TNF- $\alpha$ : Fator de necrose tumoral  $\alpha$   
VLDL: Lipoproteína de densidade muito baixa

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1</b> - Grupos experimentais com animais separados aleatoriamente	19
<b>TABELA 2</b> - Resumo da suplementação com HMB e do exercício de força sobre parâmetros de caquexia analisados e sobre crescimento tumoral.	33

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1</b> - Ciclo de Cori. Na conversão de lactato a glicose são gastos 6 moléculas de ATP ao passo que na conversão de glicose a lactato são gerados 2 moléculas de ATP.	4
<b>FIGURA 2</b> – Metabolismo protéico muscular no indivíduo caquético.	7
<b>FIGURA 3</b> – Sistema proteossoma ubiquitina-ATP dependente.	8
<b>FIGURA 4</b> – Regulação do sistema proteossoma ubiquitina-ATP dependente por citocinas e fatores de transcrição.	9
<b>FIGURA 5</b> - Estrutura do $\beta$ -hidroxi- $\beta$ -metilbutirato (HMB), Leucina, e $\alpha$ -cetoisocaproato (KIC) em mamíferos.	14
<b>FIGURA 6</b> – Massa tumoral (g).	23
<b>FIGURA 7</b> – Glicemia (mg/dL).	25
<b>FIGURA 8</b> – Laticidemia (mmol/L).	27
<b>FIGURA 9</b> – Conteúdo de glicogênio hepático ( $\mu$ mol/g).	29
<b>FIGURA 10</b> - Triacilglicerolemia (mg/dL).	31
<b>FIGURA 11</b> - Peroxidação lipídica (nanomol/mg proteína).	32
<b>FIGURA 12</b> – Ativação da via do fator de transcrição nuclear kB (NFkB) em célula tumoral.	37
<b>FIGURA 13</b> – Cascatas de citocinas liberadas na inflamação e exercício físicos.	41

## RESUMO

Aproximadamente 70% dos pacientes com câncer desenvolvem a síndrome da caquexia, a qual é caracterizada por acentuada perda de massa corporal e é responsável por 22% das mortes ocorridas por câncer. Esta síndrome é acompanhada por degradação protéica acentuada e anormalidades no metabolismo de lipídeos e carboidratos. O exercício físico tem sido investigado como forma de prevenção e tratamento de várias condições fisiopatológicas tais como as doenças cardiovasculares e câncer. Estudos com treinamento de força, em indivíduos com câncer, são escassos e estão sendo estudados. Este estudo objetivou investigar o efeito da associação da suplementação de 76mg/kg/dia de  $\beta$ -hidroxi- $\beta$ -metilbutirato (HMB) e treinamento de força, sobre o crescimento tumoral e os parâmetros bioquímicos de caquexia em ratos portadores do tumor de Walker 256. Ratos machos adultos foram divididos em 8 grupos: Sedentário (S), sedentário portador de tumor (SW), sedentário suplementado com HMB (SH), sedentário portador de tumor suplementado com HMB (SHW), exercitado (EX), exercitado portador de tumor (EXW), exercitado suplementado (EXH) e exercitado portador de tumor suplementado com HMB (EXHW). O treinamento consistiu na realização de 10 séries de saltos com duração de 30 segundos em tanques com água, com intervalo de 1 minuto entre as séries, com sobrecarga equivalente a 50% da massa corporal acoplado ao tórax, com frequência de 4 vezes por semana durante 8 semanas. No início da sexta semana de treinamento foi injetado 1mL de suspensão de células do tumor de Walker 256 ( $3 \times 10^7$  células) nos indivíduos dos grupos com tumor. A ortotanásia foi realizada 15 dias após a inoculação, seguida de coleta de sangue, fígado, músculo esquelético e tumor. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) e foram submetidos à análise de variância de duas vias, seguidos do pós-teste de Bonferroni, com nível de significância para  $p < 0,05$ . Houve redução significativa do crescimento tumoral nos animais SHW, EXW e EXHW ( $16,8 \pm 1,7g$ ;  $17,7 \pm 0,2g$ ;  $15,3 \pm 1,8g$ , respectivamente) quando comparados ao grupo SW ( $30,2 \pm 3,6g$ ). O grupo SW apresentou hipoglicemia ( $82,17 \pm 3,7$  mg/dL), hiperlaticidemia ( $2,5 \pm 0,24$  mmol/L), conteúdo de glicogênio hepático reduzido ( $87,7 \pm 1,1$   $\mu$ mol/g) e hipertriacilglicerolemia ( $121,8 \pm 11,8$  mg/dL) caracterizando quadro de caquexia. Não houve alteração na taxa de peroxidação lipídica entre os grupos ( $p > 0,05$  vs. SW). A suplementação com HMB e o modelo de exercício de força deste estudo, isolados, apresentaram atividade anti-tumoral reduzindo a taxa de crescimento do tumor. O treinamento foi eficaz em restabelecer o conteúdo de glicogênio hepático e, somente quando associada à suplementação de HMB, foi eficaz na redução da hipertriacilglicerolemia plasmática. Em suma, nossos dados sugerem que a associação da suplementação com HMB e treinamento físico não tiveram efeitos aditivos sobre o crescimento tumoral e parâmetros de caquexia, com exceção apenas da hipertriacilglicerolemia plasmática, e aventamos a hipótese que compartilhem o mesmo mecanismo de ação.

## ABSTRACT

Cachexia is a common feature of cancer patients and about 70% present body wasting which is responsible for 22% of death. Cachexia is characterized by intense catabolism of carbohydrate, lipids and protein stores. Physical activity has been demonstrated to prevent and treat several chronic diseases such as heart disease and cancer. Interesting, studies using protocol of strength in cancer is quite rare. This study aimed to investigate the effect of physical activity associated with 76 mg/kg/day of  $\beta$ -hidroxi- $\beta$ -methylbutirate (HMB) on tumor growth and cancer cachexia in Walker 256 tumor-bearing rats. Adult male rats were separated into 8 groups: sedentary (S), sedentary tumor-bearing (SW), exercised (EX) and exercised tumor-bearing (EXHW). The jump training consisted by six sets of 10 jumps in tank with water with overload equal to 50% of body weight with 1 minute of resting, four times a week during eight weeks. At the 6<sup>th</sup> week  $3 \times 10^7$  cells in 1 ml of an ascitic tumor-bearing rat was inoculated in the right flank of the tumor-bearing groups. Then, 2 weeks later the rats were killed tumor withdrawal and blood collected for biochemical measurements of cachexia as well as liver. Data are presented as mean  $\pm$  SEM and applied two way analysis followed by Bonferroni post hoc test taking  $p < 0.05$  as level of significance. Rats from SHW, EXW and EXHW presented a significant reduction of tumor growth ( $16.8 \pm 1.7g$ ;  $17.7 \pm 0.2g$ ;  $15.3 \pm 1.8g$ , respectively) when compared to SW ( $30.2 \pm 3.6g$ ). SW presented hypoglicemia ( $82.17 \pm 3.7$  mg/dL), hyperlacidemia ( $2.5 \pm 0.24$  mmol/L), reduced liver glycogen content ( $87.7 \pm 1.1$   $\mu$ mol/g) e hypertriacylglycerolemia ( $121.8 \pm 11.8$  mg/dL) showing cachexia state. There was no difference in the lipoperoxidation rate between the groups ( $p > 0.05$  vs. SW). HMB supplementation as well as anaerobic physical activity in water environment both presented anti-tumoral effect reducing tumor growth rate. Physical training was able to restore liver glycogen content. When associated to HMB supplementation was also able to reduce hypertriacylglycerolemia. Our results suggest that the associacion of HMB supplementation with anaerobic physical activity in water environment did not present additive effect on tumor growth and cancer cachexia, except just hypertriacylglycerolemia. We hypothesize that they might share the same mechanism to caused these effects.

## 1.0 INTRODUÇÃO

Mais de 11 milhões de pessoas no mundo são diagnosticadas positivamente com câncer a cada ano. O câncer é resultado do crescimento descontrolado de células geneticamente modificadas causando distúrbios das regras fundamentais do comportamento celular nos organismos multicelulares (WHO, 2007).

As células cancerosas proliferam em detrimento das normais e em alguns casos invadem e colonizam territórios, normalmente, reservados para outras células. Como estas células danificadas se proliferam indefinidamente, seu número se multiplica a cada dia, e em pouco tempo demandarão todos os nutrientes disponíveis para o corpo ou para uma de suas partes essenciais. Assim, os tecidos normais sofrem, gradativamente, morte nutricional (ALBERTS *et al.*, 1997).

Os mecanismos da perda muscular induzida pelo câncer ainda estão sendo investigados, porém sabe-se que há grande demanda de glicose pelos tumores sólidos, que provoca aumento na funcionalidade metabólica hepática, resultando em elevação do gasto energético (TISDALE *et al.*, 2000). Ainda, várias citocinas pró-inflamatórias e a ativação de vias proteolíticas, dentro das células musculares, estão relacionadas à perda muscular (SMITH *et al.*, 2005; TISDALE *et al.*, 2000; TISDALE *et al.*, 2005). Vários estudos têm evidenciado que o aumento da degradação protéica parece ser devido à ativação, principalmente, da via proteolítica proteosoma-ubiquitina dentro do músculo esquelético (LOLITE *et al.*, 1998; HASSELGREN, FISCHER, 2001; TISDALE *et al.*, 2002; TISDALE *et al.*, 2005). Isso tudo leva a balanço negativo de nitrogênio, onde a síntese protéica diminui e a degradação aumenta, resultando na intensa perda muscular.

Em pacientes com câncer tem sido demonstrado que a intervenção nutricional com suplementos e fármacos pode contribuir para reverter o processo catabólico (FERNANDES *et al.*, 1991; MAY *et al.*, 2002; PINTO JR *et al.*, 2003; PIFFAR *et al.*, 2004; SMITH *et al.*, 2005).

## 1.1 Câncer

O câncer é o produto de várias mutações somáticas acumuladas numa única célula, produzindo mudanças em seu padrão de expressão gênica ou diretamente na seqüência de DNA, onde ambos os efeitos levam a célula ao descontrole do ciclo celular. A progênie de uma célula mutante herda as mutações e origina um tumor com capacidade ilimitada de crescimento (ALBERTS *et al.*, 1999). O processo tumoral é complexo e envolve múltiplos estágios: iniciação, promoção, progressão e disseminação (CURI *et al.*, 2002). A substituição progressiva de células normais de um determinado tipo por células alteradas associada ao crescimento acelerado do tumor, contraposto à lenta taxa de mortalidade das células cancerosas resulta no crescimento da massa tumoral. Em algumas situações, as células dessa massa deslocam-se de seu local de origem, propagando-se através da circulação, formando colônias de células cancerosas por todo o organismo, denominadas metástases. Massas tumorais de origem metastática podem impedir a função de inúmeros órgãos, podendo resultar em morte (BACURAU *et al.*, 1997).

A maioria dos casos de câncer (80%) está relacionada a um grande número de fatores de risco. As mudanças provocadas no meio ambiente, pelo próprio homem, hábitos e estilo de vida, podem determinar diferentes tipos de câncer (INCA, 2005). Nos países industrializados o câncer de colo do reto é a maior causa de morte por câncer, e estratégias de prevenção com características anti-inflamatórias não-esteroidais têm atraído grande interesse de investigação (CREW, 2000).

## 1.2 Caquexia

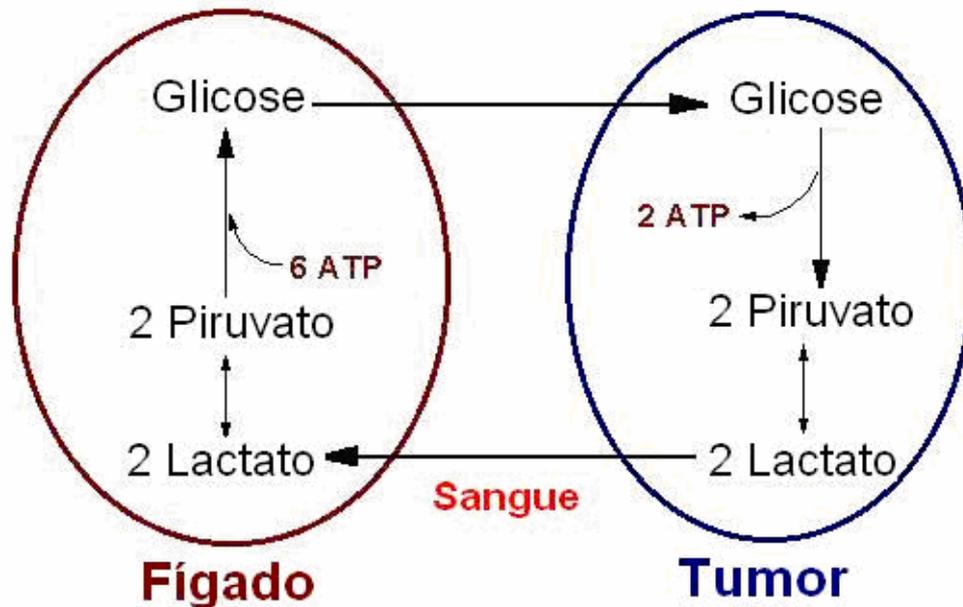
Grande parte dos pacientes portadores de câncer morrem devido à instalação no organismo de quadro catabólico intenso, simultaneamente ao crescimento tumoral. Essa condição catabólica é denominada caquexia e também serve para a descrição do quadro clínico de indivíduos portadores de outras doenças ou situações invasivas como AIDS, cirurgias, diabetes, grandes queimaduras e

traumas. O termo caquexia deriva do grego “kakos” que significa “mal”, e “hexis” que significa “condição do corpo” (TISDALE, 1997). Esta síndrome é a principal causa de morte dos pacientes com câncer avançado, variando entre 20-50% do total. Dentre as anormalidades associadas à caquexia oncológica incluem-se perda de peso, anorexia, astenia e anemia e alterações no metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas. Estas alterações nem sempre são explicadas pela anorexia acompanhante do quadro, esta que parecer ser o efeito e não a causa da perda de peso relacionada ao câncer e, suplementações nutricionais sozinhas não revertem o quadro de caquexia (TISDALE, 2004). O grau de caquexia é inversamente proporcional ao tempo de sobrevivência do paciente e sempre envolve pobre prognóstico (ARGILÉS, 2005).

Dois fatores principais explicam o desenvolvimento da caquexia oncológica: a resposta humoral do hospedeiro à presença do tumor, e os produtos liberados diretamente do tumor. Diferentes citocinas pró-inflamatórias parecem estar envolvidas na caquexia, como o fator de necrose tumoral (TNF), interleucinas 1 e 6 (IL-1 e IL-6), e interferon gama (IFN  $\gamma$ ). Tais citocinas podem ser produzidas pelo tumor ou pelos tecidos do hospedeiro. A presença dessas citocinas leva à anorexia, perda de peso, alterações no metabolismo de lipídios, por suprimirem a atividade da enzima lipase lipoprotéica (LPL) favorecendo a lipólise, aumentam o *turnover* de proteínas, elevando as concentrações dos hormônios catabólicos tais como o cortisol, glucagon e adrenalina (ARGILÉS *et al.*, 2005) e reduzem as de hormônios anabólicos como a insulina (FERNANDES *et al.*, 1991).

Alterações no metabolismo de carboidratos incluem intolerância à glicose, resistência periférica à insulina, gliconeogênese hepática aumentada e elevada atividade do ciclo de Cori (TISDALE, 2001). Tumores sólidos consomem altas taxas de glicose, pela via anaeróbica, e por conseqüência produzem grandes quantidades de lactato (TISDALE, 2000). Desta maneira, é comum observar alta laticidemia em portadores de tumor. O lactato é então convertido em glicose no fígado do hospedeiro na tentativa de manutenção da concentração sérica deste substrato. Este mecanismo conhecido como ciclo de Cori (FIGURA 1), encontra-se aumentado e pode representar prejuízo energético de 300 Kcal/dia para o portador de tumor

(EDEN, 1984). Em adição, restrita produção de insulina pode levar à intolerância à glicose, que é visto em 40% destes pacientes (TISDALE, 2000).



**FIGURA 1-** Ciclo de Cori no indivíduo com tumor. Na conversão de lactato a glicose são gastos 6 moléculas de ATP ao passo que na conversão de glicose a lactato são gerados 2 moléculas de ATP.

Das reservas energéticas de um adulto, 90% se constituem de gordura, e a perda de gordura corporal é característica da caquexia. Alta utilização de ácidos graxos como preferência energética é observada mesmo quando há presença de alta concentração de glicose plasmática (TISDALE, 1997). O aumento da atividade lipolítica libera glicerol para a gliconeogênese hepática e ácidos graxos para serem utilizados como substrato alternativo à glicose pelos tecidos periféricos. A diminuição da atividade da lipase lipoprotéica (LPL) acarreta em hipertriacilglicerolemia e compromete a captação de lipídeos pelos tecidos adiposo e muscular (TISDALE, 2001). A LPL é uma enzima estimulada pela insulina. A hiperlipidemia também está associada à produção de fatores catabólicos do próprio tumor como o LMF-fator de mobilização lipídica (TISDALE 1997). O LMF parece agir diretamente no tecido adiposo na liberação de ácidos graxos e glicerol através do aumento do AMPc intracelular de maneira semelhante à lipase hormônio sensível, enquanto as

citocinas produzidas pelos linfócitos e pelo próprio tumor agem reduzindo a LPL, resultando em aumento do fluxo de lipídios na circulação (TISDALE, 2001).

A perda de massa corporal durante a caquexia é causada principalmente pela degradação protéica muscular e visceral, sendo o maior alvo a perda de proteínas do tecido muscular esquelético. Da massa corporal total de um indivíduo saudável, aproximadamente 40% é tecido muscular (BEHNKE, 1974). Assim, fatores que contribuam para evitar ou reduzir a perda de massa magra agem diretamente para a redução de perda de peso. Redução na síntese protéica e aumento na degradação contribuem para a perda de massa magra corporal em indivíduos saudáveis e principalmente, nos pacientes com câncer. A síntese de proteínas musculares equivale a 8% da síntese corporal total nestes pacientes, enquanto que em indivíduos saudáveis a taxa é de 53%. Além disso, durante o jejum em indivíduos saudáveis, aminoácidos são mobilizados do músculo esquelético para o fígado, sendo substratos para a gliconeogênese. A redução muito prolongada de ingestão alimentar leva a diminuição da degradação das proteínas musculares, evitando desequilíbrio de nitrogênio e depleção muscular. Este mecanismo de conservação de nitrogênio está ausente em indivíduos portadores de câncer que desenvolvem caquexia, produzindo balanço negativo de nitrogênio, cujos fatores responsáveis não são completamente conhecidos (ARGILÉS, 1997).

### **1.3 Tumor de Walker 256**

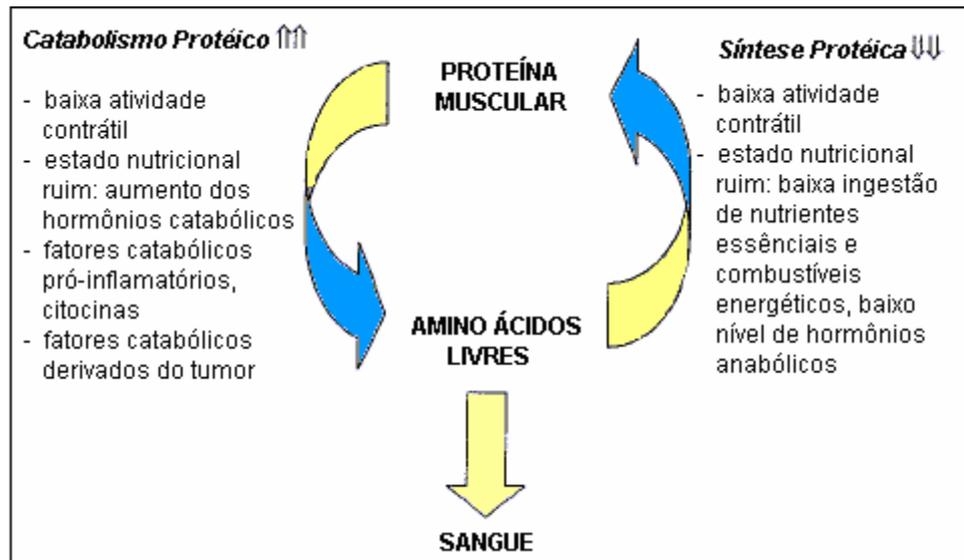
Classificado como carcinossarcoma, o tumor de Walker 256 foi identificado pela primeira vez em 1928 por George Walker, no *John's Hopkins University School of Medicine*, em glândula mamária de uma rata grávida, onde se desenvolveu espontaneamente. George Walker constatou que o crescimento do tumor diminuiu durante o período de lactação, entretanto voltou a crescer rapidamente, confirmando-se que provinha das mamas (EARLE, 1935). Agostino e Clifton (1967) descreveram a passagem do tumor da forma sólida para a ascítica. Assim, as

células tumorais na forma ascítica, poderiam novamente ser injetadas intraperitonealmente em outros animais que sempre desenvolviam o tumor ascítico. Estas mesmas células poderiam ainda ser injetadas em diferentes órgãos e tecidos, culminando com o desenvolvimento de tumor sólido. O tumor foi transplantado em ratos Sherman por inoculação subcutânea, entre os anos de 1953 e 1954, o qual se tornou palpável em uma semana, levando à morte após seis semanas (FERNANDES, 1995). O tumor de Walker 256 apresenta dois subtipos: tipo A, forma metástase, leva à morte do animal portador em aproximadamente 27 dias; e o tipo B que não forma metástase, mas induz caquexia precoce do portador, levando-o à morte em 15 dias.

Esta linhagem tumoral tem sido amplamente utilizada em estudos antineoplásicos e de caquexia induzida pelo tumor, por ser específica para ratos e facilmente transplantada (TOGNI, 2003; PINTO JR, 2003; PIFFAR, 2004).

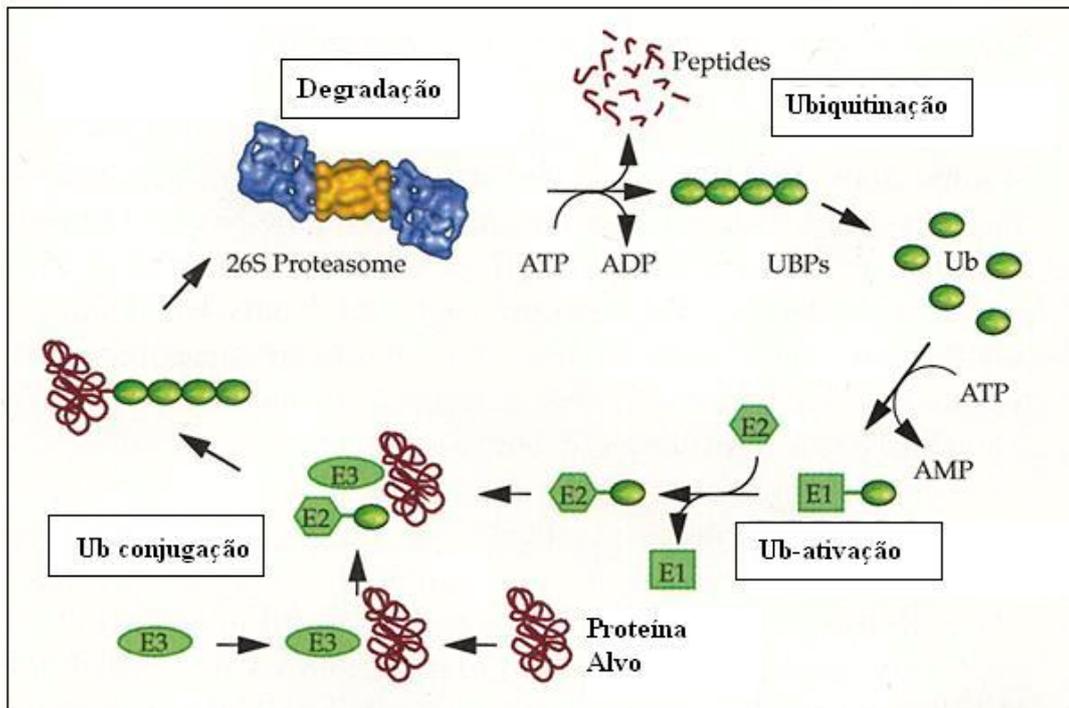
#### **1.4 Degradação do tecido muscular**

Em indivíduos saudáveis, existem mecanismos que regulam a quebra de proteínas musculares, no sentido de poupar os estoques de nitrogênio e preservar o tecido muscular, para que não exista perda funcional (BARACOS *et al.*, 2001; TISDALE, 2001). Entre estes mecanismos estão: a diminuição do gasto energético basal e o aumento da oxidação de lipídios para obtenção de energia. Portadores de tumor, geralmente, não apresentam estas adaptações e continuam a utilizar suas proteínas musculares (FIGURA 2) como fonte de aminoácidos para a gliconeogênese hepática em taxas elevadas (ARGILÉS *et al.*, 1997).



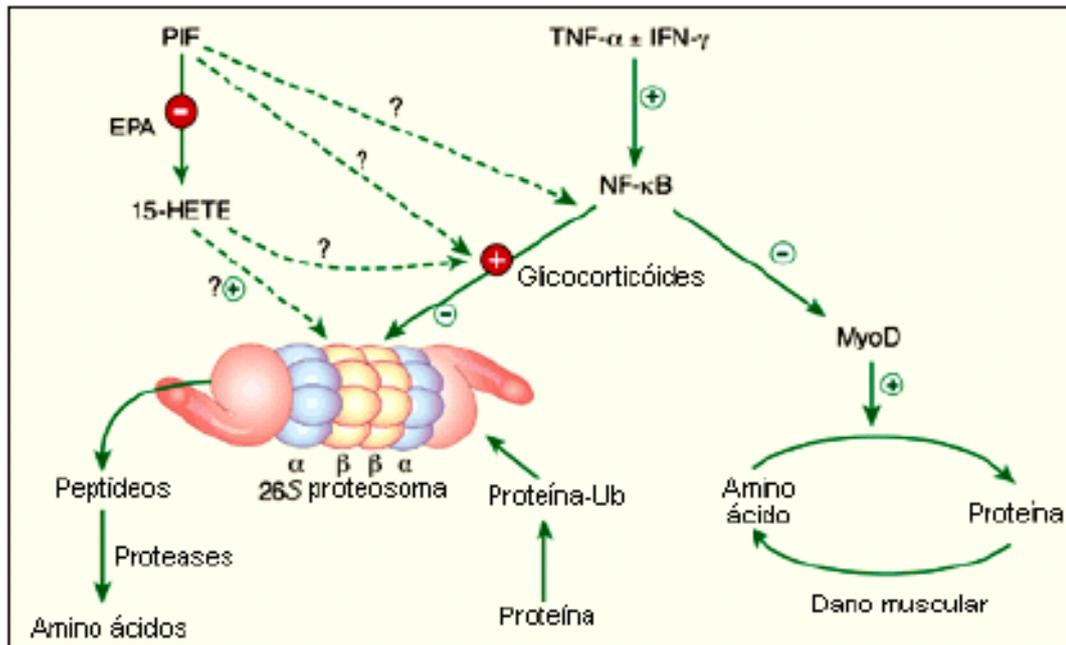
**FIGURA 2** – Metabolismo proteico muscular no indivíduo caquético.

São três as vias responsáveis pelo catabolismo das proteínas no músculo esquelético: o sistema lisossomal, o qual é responsável predominantemente pela quebra de proteínas extra celulares, como os receptores de membrana (LECKER *et al.* 1999); o sistema citosólico ativado pelo cálcio independente de ATP, o qual pode representar papel importante na destruição tecidual, necrose e autólise (GOLL *et al.*, 1992); e o sistema ubiquitina-ATP dependente, o qual se acredita ser o responsável pela quebra do conjunto de proteínas intracelulares no músculo esquelético (LECKER *et al.*, 1999; BARACOS *et al.*, 1995). Estudos, de LORITE *et al.*, (1998), mostraram que o sistema proteossoma ubiquitina-ATP dependente é responsável pela perda de músculo esquelético em camundongos caquéticos. Neste sistema, proteínas são marcadas para degradação pela ligação com a ubiquitina, o que requer a atividade de três enzimas (FIGURA 3). A proteína poliubiquitinada é então degradada em um complexo formado por multissubunidades, o proteossoma 26S, estrutura em forma de tubo constituído por quatro anéis, duas  $\alpha$  nas extremidades e duas  $\beta$  na região central (FIGURA 4). O proteossoma libera pequenos oligopeptídeos contendo de seis a nove resíduos de aminoácidos que são rapidamente degradados a aminoácidos pelas peptidases citosólicas (TISDALE, 2000).



**FIGURA 3** – Sistema proteossoma ubiquitina-ATP dependente. As proteínas são marcadas para degradação pela ligação com a ubiquitina. A proteína poliubiquitinada é então degradada em um complexo formado por multisubunidades, o proteossoma 26S, e liberada deste complexo em forma de oligopeptídeos.

Quando a proteólise, por intermédio do sistema ubiquitina-proteossoma, está acelerada no músculo, geralmente há aumento paralelo da produção de mRNAs das enzimas desta via (LECKER *et al.*, 1999). Inibindo a expressão de uma única subunidade do proteossoma, o número de proteossomas fica diminuído, bem como a atividade proteolítica e a degradação protéica (GRUNE *et al.*, 1998). Citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-1 e IFN- $\gamma$  podem induzir a expressão do mRNA da ubiquitina em músculo esquelético de ratos (LLOVERA *et al.*, 1998a; LLOVERA *et al.*, 1998b). Além disso, o TNF- $\alpha$  quando administrado em conjunto com o interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), ativa a transcrição nuclear pelo fator denominado NF- $\kappa$ B (TISDALE, 2000). O NF- $\kappa$ B inibe a expressão de outro fator o MyoD (FIGURA 4), o qual é essencial para a diferenciação das células musculares esqueléticas, para o reparo de tecidos danificados e também pode ser muito importante para a recuperação da musculatura debilitada (MEGENEY *et al.*, 1996).



**FIGURA 4** – Regulação do sistema proteossoma ubiquitina-ATP dependente por citocinas e fatores de transcrição (TISDALE, 2000).

Um fator que induz a proteólise muscular (PIF) foi isolado de indivíduos portadores do MAC-16, adenocarcinoma de roedores (TODOROV *et al.*, 1996). O mesmo PIF, produzido por este tumor, também foi encontrado na urina de pacientes com carcinoma de pâncreas, fígado, reto, cólon, mama, pulmão e ovário. Todos estes pacientes apresentavam perda de peso maior ou igual a 1 kg por mês (TODOROV *et al.*, 1999). Fatores tumorais como o PIF, aumentam a produção das subunidades do proteossoma 26S por aumentarem a expressão de um intermediário denominado ácido 15-hidroxicicosatetraenóico (15-HETE), ilustrado na FIGURA 4 (TISDALE, 2000), ação que pode ser reprimida pela administração de ácido eicosapentaenóico (EPA) (WHITEHOUSE *et al.*, 2001, SMITH *et al.*, 2005).

A fadiga generalizada é componente que pode ser visto como contribuidor, mas também como consequência da perda de tecido muscular. Atrofia muscular leva a astenia e fraqueza. Isto faz com que os indivíduos afetados apresentem baixo nível de atividade física. A inatividade muscular leva a maior

descondicionamento muscular e atrofia por desuso, o que pode agravar a sensação de fadiga em pacientes com câncer (AL-MAJID; McCARTHY, 2001a).

### **1.5 Treinamento de força e câncer**

A inatividade física é estimada como causa global de 10-16% de casos de câncer do pulmão, colon do reto e diabetes mellitus e de aproximadamente 22% de doenças cardíacas. Mundialmente, 1,9 milhões de mortes são atribuídas à inatividade física (WHO, 2007). O interesse em aumentar a expectativa de vida dos portadores de câncer encontrou, nos resultados obtidos dos exercícios físicos, importantes objetos de estudo. Alguns dos benefícios do exercício físico em humanos são: melhoras no sistema cardiovascular, pulmonar e muscular, no consumo de oxigênio, vascularização muscular, coordenação motora e equilíbrio, força e melhora na circulação linfática, diminuição da fadiga e benefícios psicológicos como melhoria do humor e sensação de progresso, pesquisas estas realizadas em caráter aeróbico, ou misto, aeróbico/anaeróbico (SMITH 1996, BATTAGLINI 2004, McNEELY 2006, STEVINSON, 2006). A utilização do exercício em pacientes sob quimioterapia demonstrou auxiliar na manutenção do balanço energético (HARVIE *et al.*, 2004) e melhorar a qualidade de vida em pacientes sobreviventes de câncer (COURNEYA *et al.*, 2004).

A maioria dos trabalhos científicos, envolvendo atividade física e câncer foi realizado utilizando-se exercício aeróbio. Isto abre janela de investigação sobre o papel de atividade física de fundo anaeróbio sobre o câncer. De fato, a literatura é escassa quando trata deste tema.

A perturbação fisiológica desencadeada por uma sessão de treinamento de força, eleva as taxas de síntese protéica no tecido muscular esquelético (FARRELL *et al.*, 1999) e pode induzir ganho significativo de força e massa magra nos indivíduos que o praticam (KADI, 2000; BARACOS, 2001). Esta observação levou alguns pesquisadores a utilizar protocolos envolvendo esse tipo de atividade em indivíduos apresentando alto índice de perda de tecido muscular. FERRANDO *et al.*, (1997) utilizaram em seu estudo, protocolo de treinamento de força, por período de

duas semanas, em indivíduos jovens, saudáveis, que deveriam ficar acamados durante o tempo de realização do experimento. Após as duas semanas, foi mensurada a síntese proteica no músculo vasto lateral da coxa nos grupos treinados e controle, não treinado. O grupo que praticou o exercício de força, enquanto estava acamado, apresentou síntese proteica 42% maior que o grupo não treinado. Em indivíduos portadores de HIV, oito semanas de treinamento de força promoveram ganhos de massa muscular, sendo os indivíduos com o mais alto grau de perda de massa magra os maiores beneficiados, atingindo ganho de 4 kg ao final das oito semanas (ROUBENOFF et al., 1999). Em outro trabalho a respeito desse mesmo estudo, foi evidenciado aumento de força e funcionalidade muscular nos indivíduos, o que acarretou em melhoria da qualidade de vida dos pacientes (ROUBENOFF; WILSON, 2001). Mesmo que os resultados sejam animadores, certa cautela deve ser tomada, pois alguns pacientes estavam ingerindo drogas antiproteolíticas durante o período do experimento como parte do conjunto de drogas para combater a proliferação viral.

NIEMAN *et al.*, (1995) observaram ganho de força em mulheres com câncer de mama, que realizaram programa de exercícios por oito semanas. O programa consistiu de exercícios de resistência e força. As pacientes faziam caminhadas de 30 minutos a 75% da frequência cardíaca máxima e, após a caminhada, sessão de 30 minutos de treinamento de força devido à característica mista do protocolo empregado, é difícil relacionar o resultado positivo somente ao treinamento de força, pois trabalhos que utilizaram protocolos de resistência em pacientes com câncer, também obtiveram resultados positivos (AL-MAJID; McCARTHY, 2001a). AL-MAJID e McCARTHY (2001b), em estudo realizado com camundongos portadores do Adenocarcinoma de Colon-26, investigaram o efeito de oito sessões de treinamento de força, sobre a massa e a quantidade de proteína no músculo extensor longo dos dedos (EDL). As sessões eram feitas em dias alternados e compostas de dez séries de seis repetições cada. No grupo portador de tumor treinado, o músculo EDL apresentou aumento de 62% na massa e de 25% no conteúdo de proteína, quando comparado ao do grupo portador de tumor não treinado. Observação interessante dos autores foi que a intensidade de treinamento utilizada no experimento não causou hipertrofia no músculo EDL do grupo treinado sem tumor, o que pode

significar que a musculatura debilitada e desgastada pode responder de maneira diferenciada a estímulos que, quando aplicados a indivíduos saudáveis, não produzem efeito.

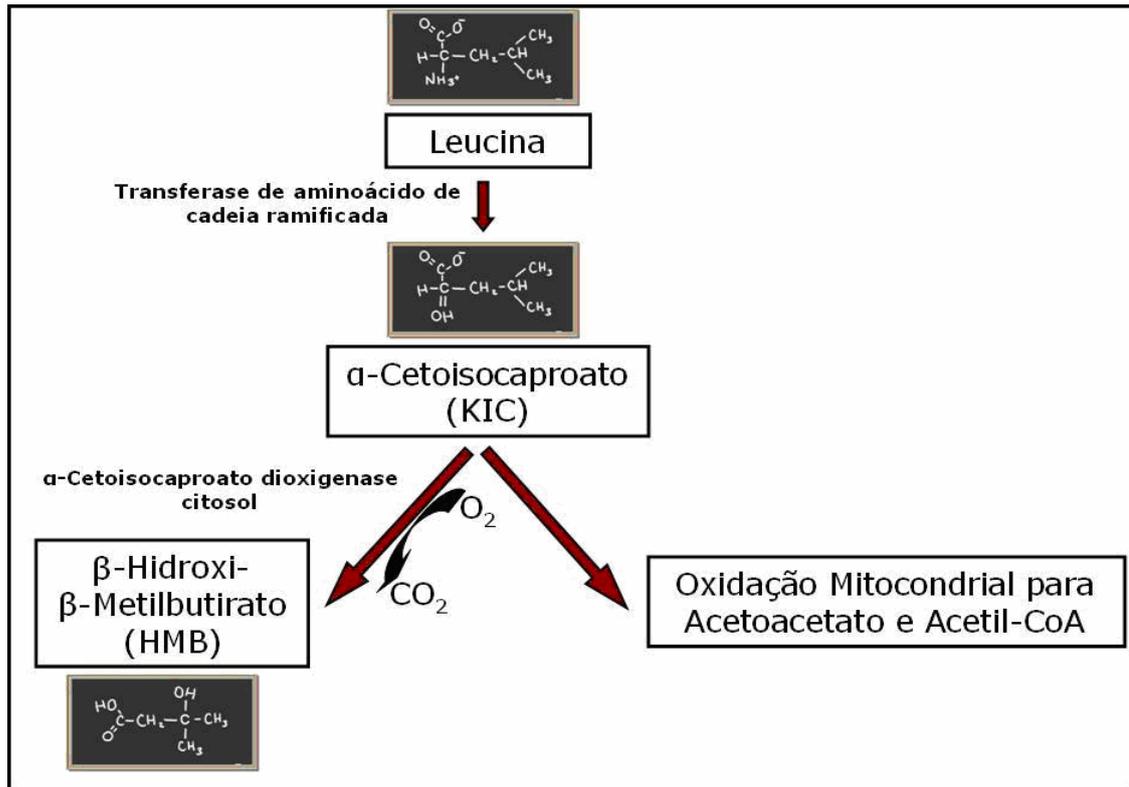
Como já comentado anteriormente, o TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral) pode estar envolvido no aumento da proteólise muscular. Em trabalho com indivíduos idosos CREIWE et. al. (2001), constataram que o exercício de força diminuiu a quantidade de TNF- $\alpha$  produzido pelo músculo e aumentou a taxa de síntese protéica. Petersen e Pedersen (2005), esclarecem um pouco mais a relação da prática de exercício regular e sua ação antiinflamatória. Este estudo evidenciou que o aumento das citocinas antiinflamatórias com a prática de exercício físico, está relacionado com a liberação de interleucina-6 (IL-6). Esta citocina, por sua vez, além de induzir a lipólise, oxidação de ácidos graxos e estar envolvida na homeostase glicêmica durante o exercício, ainda estimula a produção da IL-1ra e IL-10, interleucinas antiinflamatórias que inibem a síntese das pró-inflamatórias como IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ . O aumento plasmático de IL-6 após exercício está relacionado à intensidade de exercício, duração, a massa muscular recrutada e a capacidade de endurance do indivíduo. A IL-6 mRNA é regulado no músculo esquelético em contração e, mesmo exercícios de moderada intensidade tem grandes efeitos na liberação de IL-6 derivada do músculo. Jovens saudáveis com 3 horas de exercício a 50% da sua capacidade máxima (frequência cardíaca de 113 a 122 batimentos /minuto) apresentam aumento de 16 vezes do IL-6 mRNA e 20 vezes IL-6 circulante. Com a mesma intensidade de exercício agora aplicada a idosos saudáveis obtém-se até maiores níveis de liberação de IL-6 muscular (PEDERSEN et al., 2004). Recentemente a IL-6 tem sido chamada por alguns pesquisadores de *Miocina*, ou seja, citocina produzida e liberada a partir da contração muscular esquelética (FEBBRAIO et al., 2002; PETERSEN et al., 2005; PEDERSEN, 2007).

### **1.6 $\beta$ -Hidroxi- $\beta$ -Metilbutirato (HMB)**

A atividade regulatória do aminoácido essencial leucina, estimulando a síntese protéica e/ou inibindo a degradação das proteínas, em experimentos *in vitro*, ou *in vivo*, tem sido demonstrada por vários laboratórios (MITCH and CLARK, 1984,

OSTASZEWSKI *et al.*, 2000, ANTHONY, 2001; BOLSTER 2004). Uma das atividades metabólicas do aminoácido essencial leucina inclui a regulação do *turnover* protéico (OSTASZEWSKI *et al.*, 2000). Os efeitos metabólicos e de regulação da leucina são conhecidos há mais ou menos trinta anos, mas ainda não está claro como a leucina ou seu cetoácido,  $\alpha$ - ketoisocaproato (KIC) interagem com o metabolismo de proteínas (NISSEN *et al.*, 1997). Nesta revisão desenvolvida por Nissen, foi hipotetizado que um metabólito da leucina e do KIC denominado  $\beta$ -hidroxi- $\beta$ -metilbutirato (HMB), é responsável pelos efeitos metabólicos da leucina e do KIC.

O meio de degradação da leucina inicia com a transaminação reversível para  $\alpha$ -ketoisocaproato (KIC) nas mitocôndrias das células musculares. Porém a maioria da oxidação do KIC ocorre no fígado. No esquema proposto por Sanbourn em 1981, sobre o caminho metabólico da leucina e KIC, o HMB é produzido a partir do KIC pela ação da enzima KIC-dioxigenase no fígado e possivelmente, mas em pequena quantidade, em outros tecidos. Aproximadamente 10% da leucina presente no corpo é metabolizada para HMB pela ação desta enzima. Esta enzima requer oxigênio molecular e difere das outras enzimas do caminho metabólico da leucina. Sendo o fígado o órgão do corpo com maior atividade da enzima oxigenase, é lá que se encontra a maior produção do HMB. Os 90% restante de leucina são oxidados na mitocôndria (FIGURA 5). A produção de HMB parece aumentar em indivíduos com diabetes, podendo ser uma hipótese que explica isto o aumento da atividade da enzima dioxigenase (NISSEN *et al.*, 1997).



**FIGURA 5** – Estrutura do  $\beta$ -hidroxi-  $\beta$  -metilbutirato (HMB), Leucina, e  $\alpha$ -cetoisocaproato (KIC) em mamíferos. A Leucina é transaminada a KIC o qual pode ser convertido a HMB ou outros produtos (Nunes, 2005).

Dados obtidos em musculatura de ratos e aves incubada mostram que a ação da leucina, no *turnover* das proteínas, é quase totalmente ao nível de síntese protéica e a ação de seus metabólitos HMB/KIC é significante na inibição da quebra protéica (OSTASZEWSKI, 2000).

No fígado e músculo o HMB é convertido a  $\beta$ -hidroxi- $\beta$ -metilglutaril-CoA (HMG-CoA), via desidratação do HMB para MCA-CoA ou carboxilação direta para HMG-CoA. Apesar dos poucos estudos que comprovem isto, há muitos que mostram a hipótese de um carbono do HMB ser prontamente incorporado no colesterol. Mas ainda não está claro qual a porcentagem dos carbonos do colesterol que são derivados do HMB. O HMG-CoA citoplasmático produzido do HMB pode providenciar um substrato adequado para a enzima HMG-CoA reductase, a qual é

uma importante etapa da formação do colesterol (NISSEN, 1997).

Uma vez que os aminoácidos têm importante ação no *turnover* protéico, alguns estudos têm investigado sobre a suplementação com  $\beta$ -hidroxi- $\beta$ -metilbutirato (HMB), e sua ação na diminuição de perda de massa muscular, alterações da resposta imunitária e diminuição de gordura corporal (NISSEN, 1996; VUKOVICH, 1997; PETERSON, 1999; GALLAGHER, 2000; OSTASZEWSKI, 2000; VUKOVICH, 2001; MAY *et al.*, 2002; NISSEN, 2002; SIWICKI, 2004; SMITH, 2005). Porém pouco se sabe sobre seus efeitos sobre o metabolismo celular, bem como nas patologias tais como o câncer.

### **1.7 HMB e câncer**

A anorexia é a desnutrição causada pelo estado de caquexia em pacientes com câncer, consequência do desequilíbrio entre a necessidade nutricional do paciente, a demanda do tumor e a disponibilidade de nutrientes no corpo. Mudanças no paladar e aversão à comida, juntamente com causas psicológicas tais como depressão, também podem contribuir na redução da ingestão alimentar (ÁRGILES, 2005a).

A dinâmica normal do *turnover* protéico em adultos requer ingestão protéica simplesmente para substituir os aminoácidos degradados continuamente no processo de renovação (MCARDLE, 2003). Indivíduos caquéticos que passam por anorexia, onde a ingestão protéica está diminuída, podem se beneficiar da suplementação de aminoácidos (ARGILÉS, 1990).

A molécula de HMB é bastante semelhante à molécula do ácido graxo de cadeia curta, o butirato. Estes dois compostos diferem apenas pela presença de uma hidroxila, radical OH, e um radical metila CH<sub>3</sub>, presentes num carbono na molécula de HMB. Desta maneira, pode-se levantar a hipótese que tanto o HMB quanto o butirato possam compartilhar alguns efeitos biológicos (NUNES, 2005). O butirato induz a efeito antiproliferativo e antidiferenciação em várias linhagens celulares de carcinoma de cólon, bem como em vários tipos de células neoplásicas, em concentrações fisiológicas. A atividade anticrescimento e protetora contra câncer de

cólon acontecem via impedimentos da diferenciação, parada do ciclo celular e indução de apoptose em colonócitos transformados (HASSIG; TONG; SCHREIBER, 1997).

A suplementação somente com HMB, ou ainda associada ao conhecido inibidor da degradação protéica, o ácido eicosapentaenóico (EPA), em ratos com tumor MAC16, provou ser eficiente em aumentar a síntese protéica e diminuir a degradação, pois produziram baixa regulação na expressão da atividade proteolítica da via proteosoma-ubiquitina (SMITH, 2005). Como citado anteriormente, o sistema proteosoma-ubiquitina é considerado a via mais importante de degradação protéica em condições catabólicas que incluem acidose metabólica, trauma, e perda de peso induzida pelo câncer (LECKER, 1999). Por isto o HMB tem sido considerado efetivo em situações catabólicas como o câncer.

Atividade física causa aumento na tensão muscular que é o estímulo primário para dar início ao crescimento do músculo esquelético (hipertrofia). OSTASZEWSKI *et al.*, (2000), SMITH *et al.*, (2005) e outros estudos demonstraram ação efetiva do HMB na inibição da quebra protéica. Curiosamente há poucos trabalhos demonstrando o efeito da associação da suplementação com HMB e exercício de força em portadores de câncer (NUNES, 2005). Em adição, não há relato do efeito desta associação sobre crescimento tumoral e parâmetros de caquexia.

## 2.0 OBJETIVOS

Este estudo objetiva investigar o efeito da suplementação com HMB e treinamento de força sobre parâmetros de caquexia e a taxa de crescimento tumoral em ratos portadores do tumor de Walker 256.

Para alcançar estes objetivos foram avaliadas as seguintes variáveis:

- Massa tumoral;
- Concentrações plasmáticas de glicose, lactato e triacilglicerol;
- Conteúdo de glicogênio hepático;
- Peroxidação lipídica no tecido tumoral.

## 3.0 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Animais

Todos os protocolos envolvendo animais foram aprovados pelo comitê de ética em experimentação animal do SCB-UFPR. Foram utilizados 120 ratos machos adultos da linhagem *Wistar*, provenientes do Biotério da Universidade Federal do Paraná, UFPR – Campus do Centro Politécnico, Curitiba, PR. Os animais (70 dias) foram mantidos em ambiente claro/escuro (22:00h/10:00h) com temperatura controlada (23°C), alimentação e água *ad libitum*. Foram realizados três experimentos com duração de 8 semanas.

### 3.2 Suplementação

A suplementação do  $\beta$ -hidroxi- $\beta$ -metilbutirato foi administrada na forma de cálcio-HMB em pó na dosagem de 76 mg/Kg, por meio de gavagem, diariamente, por oito semanas. A cada 15 dias eram preparadas soluções estoque, contendo HMB e sacarose (10%), pois, após duas semanas existe degradação progressiva do HMB em solução (NISSEN *et al.*, 1996). Dessas soluções eram retiradas alíquotas diárias para suplementação dos animais. A sacarose estava presente nas soluções

com objetivo de retardar o processo de esvaziamento gástrico, o que evita o aumento brusco na concentração de HMB plasmático e conseqüentemente sua excreção renal (VUKOVICH *et al.*, 2001).

### **3.3 Treinamento**

O treinamento teve duração de oito semanas e freqüência de 4 dias por semana. Após período de adaptação ao meio líquido (1 hora de natação por dia durante 2 dias sem utilização de carga), os animais dos grupos exercício realizaram programa de atividade física constituído de 10 séries com duração de 30 segundos de saltos em tanques com água, com intervalo de 1 minuto entre as séries, com sobrecarga equivalente a 50% da massa corporal de cada rato, acoplado ao tórax (adaptado de ROGATTO, 2001). A estrutura utilizada para os exercícios foi um sistema de natação constituído por tubos de PVC com diâmetro de 25 cm e 48 cm de altura (VIEIRA, 1988). A profundidade da água era correspondente a 150% do comprimento corporal do rato e a temperatura da água era mantida a  $32 \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

### **3.4 Inoculação do tumor**

Por volta da sexta semana de treinamento 1 mL de solução contendo  $3 \times 10^7$  células do Tumor de Walker 256 foi inoculada subcutaneamente no flanco direito dos animais. Após 15 dias da inoculação, coincidindo com a oitava semana de treinamento, os animais foram ortotansados para coleta e análise sanguínea e dos tecidos. A solução de células tumorais inoculadas foram obtidos de um animal com tumor ascítico. As células do tumor de Walker 256 foram originariamente cedidas ao prof. Dr. Luiz Claudio Fernandes em 1992 pelo Dr. Rui Curi, ICB-1-USP. A contagem das células a serem inoculadas foi realizada em câmara de Neubauer sob microscopia de luz utilizando o corante vital azul de tripan a 1%.

Após todos estes procedimentos, os seguintes grupos foram estabelecidos, com animais separados ao acaso:

**TABELA 1-** Design experimental (n=5 por grupo).

<b>Grupo</b>	<b>Tratamento</b>
S	Sedentário sem suplementação
SW	Sedentário portador de tumor
SH	Sedentário suplementado com HMB
SWH	Sedentário portador de tumor suplementado com HMB
EX	Exercitado sem suplementação
EXW	Exercitado portador de tumor sem suplementação
EXH	Exercitado suplementado com HMB
EXWH	Exercitado portador de tumor suplementado com HMB

### **3.5 Pesagem corporal e tumoral**

Durante o período experimental, os animais foram pesados duas vezes por semana no período da manhã, para o controle da dosagem da suplementação e para ajuste de sobrecarga de treinamento, utilizando-se a balança Urano modelo UDI 10000/1. Após a morte dos animais, o tumor foi retirado e pesado em balança Denver Instrument XL-410.

### **3.6 Ortotanásia dos animais**

Após 8 semanas de treinamento coincidindo com o 15º dia após a implantação do tumor, os animais foram mantidos por 48h em repouso sendo somente suplementados, mais jejum de 12h, e imediatamente após foi realizada a ortotanásia dos ratos com o auxílio de guilhotina. Este método foi utilizado para facilitar a retirada de grande volume de sangue, necessário às análises séricas de lactato, glicemia e triacilglicerol.

### **3.7 Mensuração do Lactato**

Foi determinado pelo método enzimático, segundo ENGLE e JONES (1978). Inicialmente fez-se a desproteinização do soro, pela adição de 50 µL de ácido tricloroacético (TCA a 25%) a 0,5 mL da amostra e a mistura agitada em vórtex, centrifugada por 1 minuto a 13.000 rpm em centrífuga Eppendorf modelo 5810R. Em seguida, foi coletado 250µL do sobrenadante e adicionado 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. Em seguida, foi pipetado 100 µL do soro neutralizado em tubos de ensaio contendo 1 mL do tampão do ensaio (descrito abaixo) e, após 45 minutos, fez-se leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda 340 nm. O princípio dessa mensuração consiste na conversão do lactato a piruvato pela ação da lactato desidrogenase (LDh), ocorrendo consumo de NAD<sup>+</sup> com formação estequiométrica de NADH, o qual pode ser monitorado espectrofotometricamente, fornecendo a concentração de lactato (mmol/L) existente na amostra.

### **3.8 Mensuração da Glicemia**

A glicose foi quantificada por método colorimétrico glicose oxidase, utilizando um kit de glicose Bioliquid, conforme especificações do fabricante. A leitura da absorbância foi realizada em leitor de microplaca a 505 nm e os resultados foram expressos em mg/dL.

### **3.9 Mensuração do conteúdo de glicogênio hepático**

O conteúdo de glicogênio (umol/g de tecido) foi determinado segundo LEIGHTON *et al.,...* (1989) adaptado. Foram pesadas aproximadamente 90mg do fígado e colocadas em tubos de ensaio contendo 500 µL de KOH 1M e deixados em banho a 60 °C por 30 minutos, para a digestão do tecido. Após a digestão, as amostras foram homogeneizadas em vórtex e pipetados 100 µL em tubos. Em seguida adicionou-se 17,5 µL de ácido acético glacial e 500 µL de tampão acetato contendo amiloglucosidase (1%), e submetidas ao banho-maria (37 °C) por 2 horas. Ao final deste período centrifugou-se as amostras por 5 minutos a 1200 rpm

(Eppendorf modelo 5810R) e 100 µL de cada amostra foi colocada em novos tubos de ensaio contendo 1mL do tampão Trietanolamina (TEA). Após 40 minutos as amostras foram lidas no espectrofotômetro ULTROSPEC 2000 (Pharmacia Biotech) em comprimento de onda de 340 nm.

### **3.10 Mensuração de triacilglicerol plasmático (TAGs)**

A concentração plasmática de TAG foi determinada por método enzimático colorimétrico, utilizando o kit Triglicérides GPO-Trinder, conforme especificações do fabricante. A leitura da absorbância foi realizada em leitor de microplaca a 500 nm e os resultados foram expressos em mg/dL.

### **3.11 Peroxidação lipídica**

A taxa de peroxidação lipídica foi mensura pelo método FOX ou xilenol laranja, conforme descreve Jiang *et al.*, (1991). Este método quantifica a formação de hidroperóxidos durante a peroxidação lipídica. Baseia-se no princípio de que hidroperóxidos oxidam ferro a íon férrico e por sua vez este íon se liga ao corante xilenol laranja. As amostras de tumor de Walker 256 foram homogeneizadas em 5 volumes de tampão fosfato (PBS) 0,1M em pH 7,4 (Homogeneizador Bosch Centralfer CGS 27 - 25000 rpm/min). O tecido foi então diluído novamente em PBS na proporção de 1:10, e 100uL deste homogeneizado foram adicionados à 900uL de solução de trabalho, contendo:

- MeOH 90%
- 100uM xilenol laranja (Sigma)
- 25mM de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- 4mM de BHT
- 250 uM de Fe<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

As amostras foram incubadas por 2 horas à temperatura ambiente e posteriormente lidas no espectrofotômetro ULTROSPEC 2000 (Pharmacia) em

comprimento de onda de 560nm.

A fórmula utilizada para o cálculo foi:

$$\frac{\text{D.O.}}{\epsilon} \times \text{dil. do PBS} \times \text{dil. da solução de trabalho} \times \frac{1}{\text{mg de tecido}}$$

( $\epsilon = 4,3 \times 10^{-4}$ )

### **3.12 Quantificação das Proteínas para peroxidação lipídica.**

As proteínas foram quantificadas pelo método de BRADFORD (1976). Este método se baseia na ligação do corante (Coomassie Brilliant Blue G-250) com moléculas de proteínas da amostra, formando um complexo de cor azul. O corante reage, preferencialmente, com unidades de arginina e, numa extensão menor, com histidina, lisina, tirosina, triptofano e fenilalanina (COMPTON e JONES, 1985).

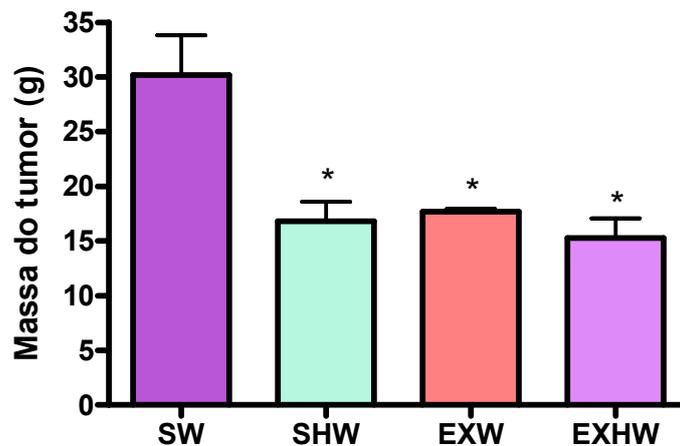
### **3.13 Tratamento Estatístico**

Os dados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) e foram submetidos à análise de variância de duas vias (two way variance analysis), seguida do teste de Bonferroni, com nível de significância para  $p < 0,05$ .

## 4.0 RESULTADOS

### 4.1 Massa dos tumores

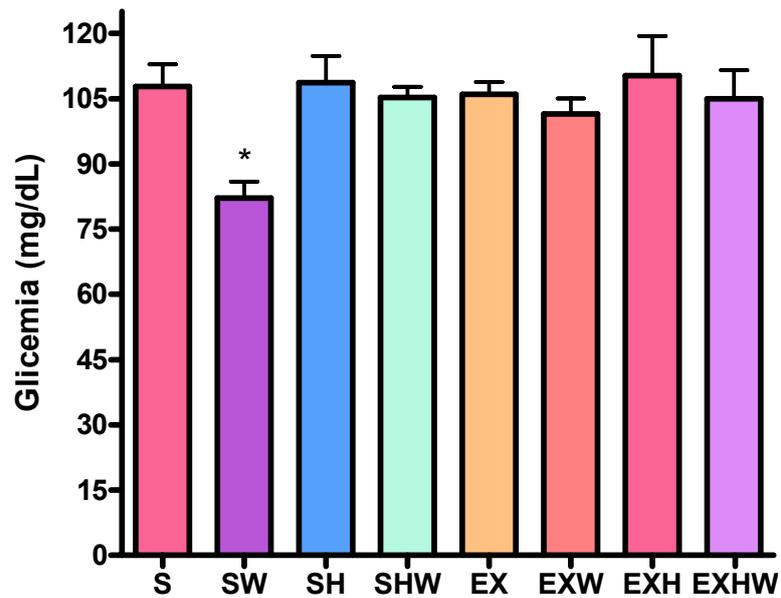
A massa tumoral (g) no 15º dia após inoculação do tumor de Walker 256 está apresentado na FIGURA 6. No grupo sedentário sem suplementação (SW) a massa tumoral correspondeu a  $30,2 \pm 3,6$  g. A suplementação com HMB no grupo sedentário (SHW) reduziu a massa tumoral para  $16,8 \pm 1,7$ g o que foi significativamente diferente quando comparada à do grupo SW ( $p < 0,05$ ). A atividade física (EXW) induziu a uma massa tumoral de  $17,7 \pm 0,2$ g a qual foi estatisticamente significativa quando comparada à do grupo SW ( $p < 0,05$ ), mas similar à do SHW ( $p > 0,05$ ). A associação da atividade física com a suplementação com HMB (EXHW) diminuiu a massa tumoral para  $15,3 \pm 1,8$ g ( $p < 0,05$  vs. SW), contudo não foi diferente da dos grupos SHW e EXW ( $p > 0,05$ ).



**FIGURA 6-** Massa tumoral (g) dos animais sedentários (SW), sedentários suplementados com HMB (SHW), exercitados (EXW) e exercitados suplementados com HMB (EXHW). Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 6 animais por grupo. \*  $p < 0,05$  vs. SW.

## 4.2 Glicemia

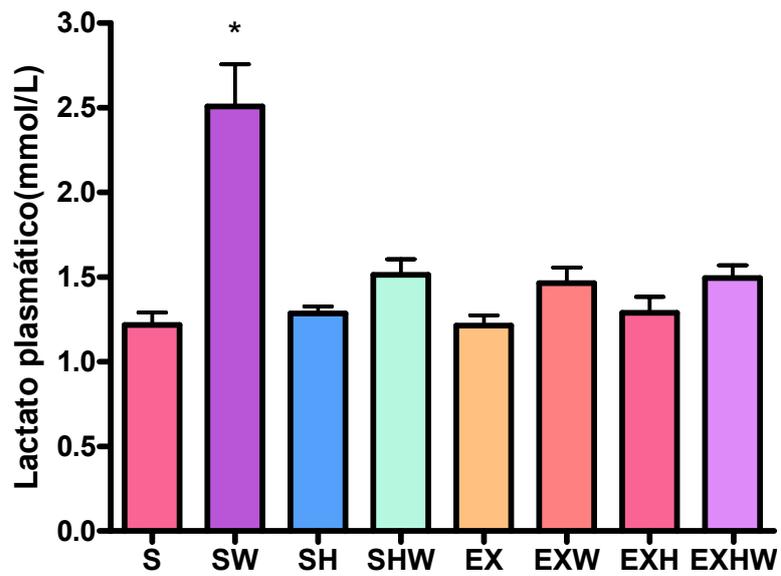
A concentração sérica de glicose dos animais investigados está apresentada na FIGURA 7. Nos animais não portadores de tumor suplementados ou não (SH ou S) exercitados suplementados ou não (EXH ou EX) a glicemia teve média de 105 mg/dL. A presença tumoral no grupo sedentário (SW) reduziu a glicemia para  $82,17 \pm 3,7$  mg/dL, a qual foi significativamente menor quando comparada à dos animais sem tumor ( $p < 0,05$  vs. S, SH, EX e EXH). A suplementação com HMB no grupo portador de tumor (SHW) impediu a hipoglicemia ( $p < 0,05$  vs. SW). O treinamento físico no grupo portador de tumor (EXW) também impediu a hipoglicemia ( $p < 0,05$  vs. SW) sendo de valor similar à encontrada no grupo SHW ( $p > 0,05$ ). A associação da atividade física e suplementação (EXHW) não promoveu efeito aditivo sobre a glicemia, sendo similar ao observado a todos os demais grupos, exceto quando comparado ao grupo SW ( $p < 0,05$ ).



**FIGURA 7** – Glicemia (mg/dL) dos animais dos grupos sem tumor sedentário (S), sedentário portador de tumor (SW), sedentário suplementado com HMB (SH), sedentário suplementado com HMB portador de tumor (SHW), exercitado (EX), exercitado portador de tumor (EXW), exercitado suplementado com HMB (EXH) e exercitado suplementado com HMB portador de tumor (EXHW). Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 12 animais por grupo. \*  $p < 0,05$  quando comparado aos demais grupos.

### 4.3 Lactato

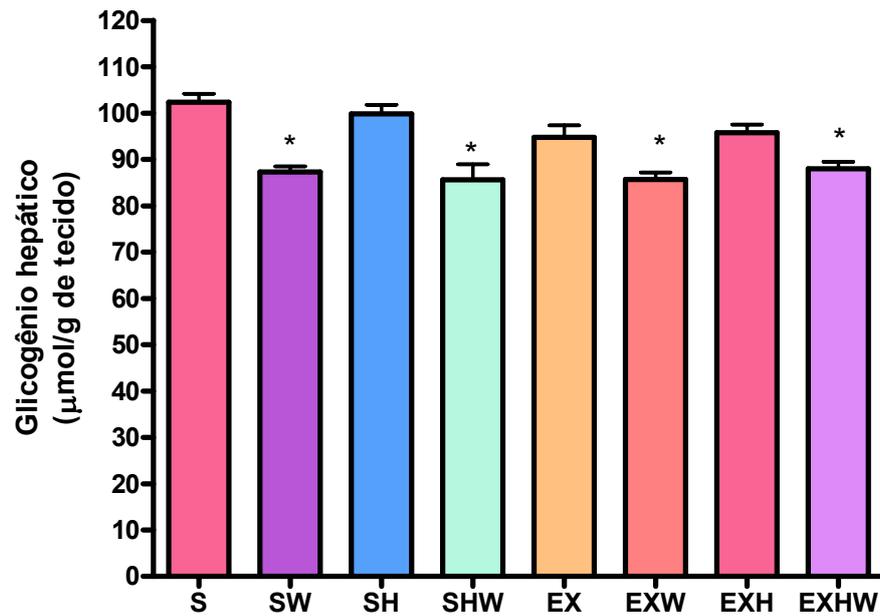
A concentração plasmática de lactato dos animais investigados está apresentada na FIGURA 8. Nos animais não portadores de tumor suplementados ou não (SH ou S) exercitados suplementados ou não (EXH ou EX) a laticidemia foi aproximadamente de 1,5 mmol/L. A presença tumoral no grupo sedentário (SW) incrementou a laticidemia para  $2,5 \pm 0,24$  mmol/L, a qual foi significativamente maior quando comparada à dos animais sem tumor ( $p < 0,05$  vs. S, SH, EX e EXH). A suplementação com HMB no grupo portador de tumor (SHW) impediu a hiperlaticidemia ( $p < 0,05$  vs. SW). A prática da atividade física no grupo portador de tumor (EXW) também impediu a hiperlaticidemia ( $p < 0,05$  vs. SW) sendo de valor similar à encontrada no grupo SHW ( $p > 0,05$ ). A associação da atividade física com a suplementação (EXHW) não promoveu efeito aditivo sobre a laticidemia, sendo similar ao observado nos demais grupos, exceto quando comparado ao grupo SW ( $p < 0,05$ ).



**FIGURA 8** – Laticidemia (mmol/L) dos animais dos grupos sem tumor sedentário (S), sedentário portador de tumor (SW), sedentário suplementado com HMB (SH), sedentário suplementado com HMB portador de tumor (SHW), exercitado (EX), exercitado portador de tumor (EXW), exercitado suplementado com HMB (EXH) e exercitado suplementado com HMB portador de tumor (EXHW). Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 12 animais por grupo. \*  $p < 0,05$  quando comparado aos demais grupos.

#### 4.4 Conteúdo de glicogênio hepático

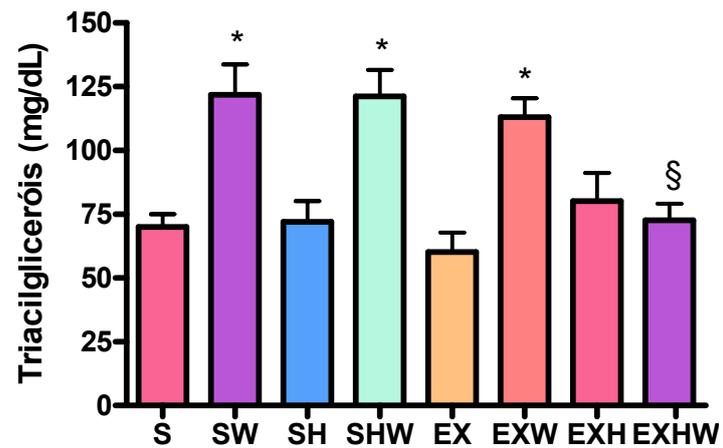
O conteúdo de glicogênio no fígado dos animais está apresentado na FIGURA 9. Nos animais portadores de tumor suplementados ou não (SHW ou SW) o conteúdo de glicogênio foi de  $87,7 \pm 1,1 \mu\text{mol/g}$  de tecido, significativamente menor quando comparado ao dos animais sem tumor sedentários S e SH, ( $p < 0,05$ ), porém não apresentando diferença comparado aos animais exercitados sem tumor, EX e EXH, ( $p > 0,05$ ). Nos animais portadores de tumor exercitados, suplementados ou não (EXHW ou EXW) o conteúdo de glicogênio foi de aproximadamente  $87 \mu\text{mol/g}$  de tecido, significativamente menor quando comparado ao dos animais sedentários sem tumor, S e SH ( $p < 0,05$ ) porém sem diferença quando comparados aos grupos exercitados sem tumor, EX e EXH ( $p > 0,05$ ).



**FIGURA 9** - Conteúdo de glicogênio hepático ( $\mu\text{mol/g}$  de tecido) dos animais dos grupos sem tumor sedentário (S), sedentário portador de tumor (SW), sedentário suplementado com HMB (SH), sedentário suplementado com HMB portador de tumor (SHW), exercitado (EX), exercitado portador de tumor (EXW), exercitado suplementado com HMB (EXH) e exercitado suplementado com HMB portador de tumor (EXHW). Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 12 animais por grupo. \*  $p < 0,05$  quando comparado aos grupos S e SH.

#### 4.5 Triacilglicerol

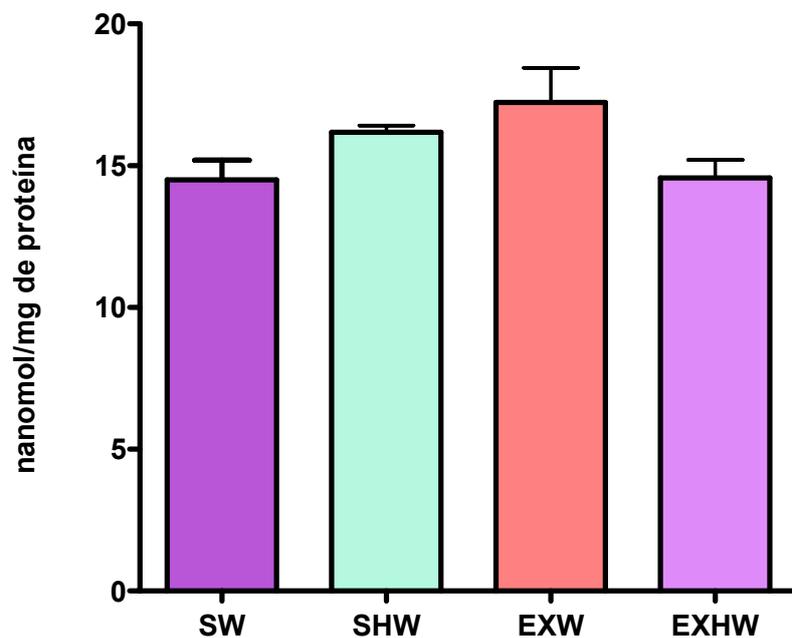
A concentração sérica de triacilglicerol dos animais estudados está apresentada na FIGURA 10. Nos animais não portadores de tumor suplementados ou não (SH ou S) exercitados suplementados ou não (EXH ou EX) a triacilglicerolemia foi aproximadamente de 75 mg/dL. A presença tumoral no grupo sedentário (SW) incrementou a triacilglicerolemia para  $121,8 \pm 11,8$  mg/dL, a qual foi significativamente maior quando comparada à dos animais sem tumor ( $p < 0,05$  vs. S, SH, EX e EXH). A suplementação com HMB no grupo portador de tumor (SHW) não reduziu a triacilglicerolemia ( $p < 0,05$  vs. S e SH). A prática da atividade física no grupo portador de tumor (EXW) também não conseguiu reduzir a hipertriacilglicerolemia ( $p < 0,05$  vs. EX e S) sendo de valor similar à encontrada no grupo SW ( $p > 0,05$ ). A associação da atividade física e suplementação (EXHW) promoveram efeito redutor da triacilglicerolemia induzida pelo tumor, sendo similar ao observado nos animais sem tumor ( $p > 0,05$ ).



**FIGURA 10-** Triacilglicerolemia (mg/dL) dos animais dos grupos sem tumor sedentário (S), sedentário portador de tumor (SW), sedentário suplementado com HMB (SH), sedentário suplementado com HMB portador de tumor (SHW), exercitado (EX), exercitado portador de tumor (EXW), exercitado suplementado com HMB (EXH) e exercitado suplementado com HMB portador de tumor (EXHW). Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 12 animais por grupo. \*  $p < 0,05$  vs. S, SH, EX, EXH e EXHW. §  $p < 0,05$  vs. SW, SHW e EXW.

#### 4.6 Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica no tumor dos animais sedentários (SW), suplementados com HMB (SHW), exercitados (EX) e suplementados com HMB (EXHW) está representada na FIGURA 11. Não houve alteração na taxa de peroxidação lipídica entre os grupos estudados seja pela atividade física, suplementação ou associação de ambas ( $p > 0,05$  vs. SW).



**FIGURA 11** - Peroxidação lipídica dos animais sedentários (SW), sedentários suplementados com HMB (SHW), exercitados (EXW) e exercitados suplementados com HMB (EXHW). Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 12 animais por grupo.

	Tumor	HMB	Exercício	HMB + Exercício
Crescimento tumoral	↑	↓	↓	↓
Glicose plasmática	↓	↑	↑	↑
Lactato plasmático	↑	↓	↓	↓
Glicogênio hepático	↓	NA	NA	NA
Triacilglicerol plasmático	↑	NA	NA	↓↓
Peroxidação lipídica	NA	NA	NA	NA

**TABELA 2-** Resumo da suplementação com HMB e do exercício de força sobre parâmetros de caquexia analisados e sobre crescimento tumoral. (NA = Nenhuma alteração quando comparados à SW; ↓↓ = efeito facilitador).

## 5.0 DISCUSSÃO

A síndrome da caquexia associada ao câncer contribui imensamente na redução da habilidade física e mortalidade. Caquexia também é observada em uma variedade de outras condições tais como cirurgia, trauma, sepse e síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS). Caquexia é caracterizada por anorexia, perda de peso, saciedade prematura, intenso catabolismo periférico com depleção dos depósitos de gorduras (triacilglicerol), carboidratos (glicogênio hepático e muscular) e proteínas no músculo (TISDALE, 2004). Esta depleção dos estoques é devido ao crescimento tumoral (FIGURA 6), o qual tem metabolismo anaeróbio (ARGILES, 1997), o que resulta em hipoglicemia (FIGURA 7), hiperlaticidemia (FIGURA 8), conteúdo reduzido do glicogênio hepático (FIGURA 9) e hipertriacilglicerolemia (FIGURA 10). Tumor de Walker 256 por induzir estas alterações tem sido proposto como potencial modelo para investigação de possíveis interventores que possam impedir ou reduzir crescimento tumoral e caquexia (TOGNI *et al.*, 2003). Estudos com este modelo sugerem metabólitos (como, por exemplo, as concentrações sanguíneas de glicose, lactato e triacilglicerol) que poderiam ser usados em outros modelos e em estudos com humanos. Em suma, devido ao crescimento tumoral os animais do grupo não suplementado (SW) apresentaram quadro de caquexia (FIGURAS 6 -10).

O quadro de caquexia é o principal impeditivo para o tratamento do câncer, portanto a melhor maneira de tratar a caquexia é curar o câncer. Conhecidas estratégias são utilizadas para o tratamento do câncer e caquexia, tais como quimioterapia, radioterapia, imunoterapia, hormonioterapia e mais recentemente os nutracêuticos. Associação da combinação destes agentes também tem sido utilizada (MAY *et al.*, 2002; PIFFAR *et al.*, 2003; PINTO JUNIOR *et al.*, 2004).

Pela observação de que indivíduos praticantes de atividade física apresentam menores índices de câncer, vários trabalhos começaram a utilizar a atividade física na investigação como forma de tratamento, sendo demonstrado efeitos benéficos neste sentido (COSTA ROSA *et al.*, 2004; McNEELY *et al.*, 2006).

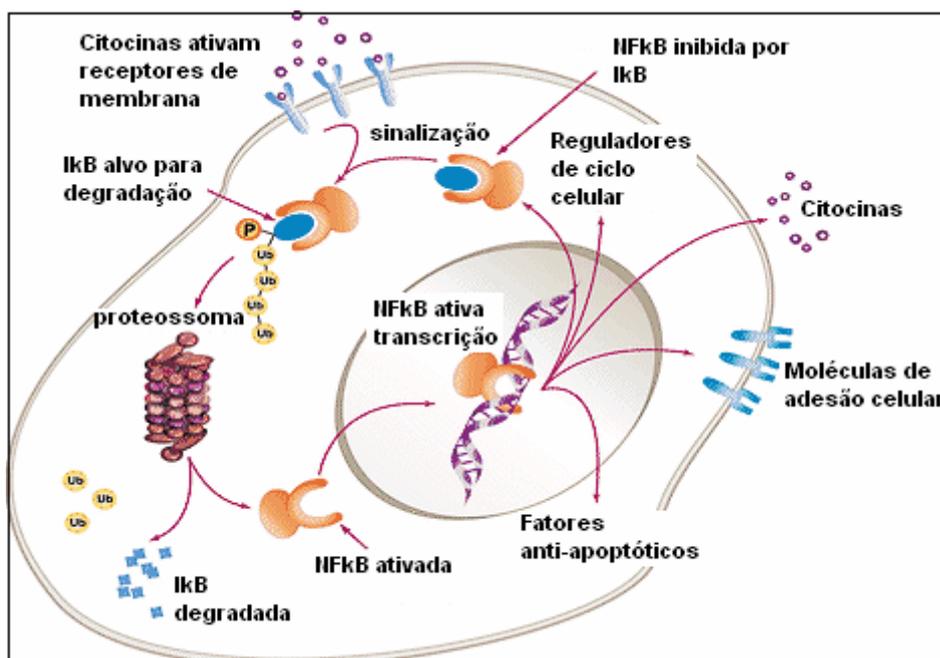
Trabalhos utilizando diferentes suplementos como por exemplo, óleo de peixe (PINTO JUNIOR *et al.*, 2004; MUND, 2004; MINUZZI, 2006;) e HMB

(SMITH *et al.*, Nunes, 2005) tem mostrado terem ação anti-tumoral. HMB associado com outras estratégias de prevenção e tratamento pouco foi tentado, abrindo campo para novas abordagens experimentais. A suplementação com HMB aos animais sedentários durante 8 semanas foi hábil em reduzir a taxa de crescimento tumoral significativamente em relação ao grupo não suplementado (SW). Interessantemente, esta redução foi acompanhada de restauração ao normal das concentrações séricas de glicose e lactato (FIGURAS 7 e 8) mas não às do conteúdo de glicogênio hepático e triacilglicerolemia circulante (FIGURAS 9 e 10). Estes dados demonstram que a caquexia nos ratos com tumor de Walker 256 não eram resultados do tamanho do tumor e sim da presença do tumor. Nossos dados podem ser corroborados pelos de Pizato *et al.*, (2005) que ao oferecerem dieta com razão de ácido graxo n-6:n-3 de 6:1 demonstraram que a taxa de crescimento tumoral não se alterou, contudo foi hábil em reverter todos os parâmetros de caquexia também por nós examinados. A razão pela qual não houve modificação dos outros dois parâmetros é por nós desconhecida e merece investigação.

Uma das hipóteses que levantamos é a ação direta do HMB sobre as células do tumor de Walker 256, aumentando a apoptose e/ou diminuindo a proliferação celular. Nunes (2005) advoga sobre a idéia ainda não comprovada que o HMB possa compartilhar alguns efeitos biológicos com a molécula do ácido graxo de cadeia curta, o butirato. O butirato é naturalmente encontrado no colon humano, sendo o principal composto produzido a partir da fermentação da dieta de fibras (MANDAL, 2001) e tem efeito anti-proliferativo e anti-diferenciação em várias linhagens celulares de carcinoma de cólon, em concentrações fisiológicas (HILL, 1995). A molécula de HMB é muito semelhante à do butirato, onde diferem apenas pela presença de um radical hidroxila OH, e um radical metila CH<sub>3</sub>, presentes no carbono β da molécula do HMB. O mecanismo pelo qual o HMB age nas células tumorais pode ser similar ao proposto por Hill (1995). O autor hipotetiza que o butirato tem ação protetora impedindo a diferenciação, parada no ciclo celular e indução de apoptose em colonócitos transformados. As prostaglandinas da série E2 (PGE2) são atuantes na indução da caquexia e/ou promoção do crescimento tumoral (PRESCOTT *et al.*, 2000). Consequentemente altas concentrações da enzima COX-

2 sempre são relacionadas a processos neoplásicos (KIRSCHENBAUM, 2001; DEMPKE, 2001). O butirato inibe o aumento da expressão da COX-2, induzido por citocinas, e esta habilidade pode estar relacionada a uma série de parâmetros, incluindo inibição de histona deacetilases (CREW, *et al.*, 2000; BLAGOSKLONNY *et al.*, 2002; TONG *et al.*, , 2004; ZHANG *et al.*, 2004), indução da atividade da protease caspase-3 através de uma via mitocondrial/citocromo c-dependente (MEDINA, 1997), aumento da apoptose via Fas (BONNOTTE, 1998) e ainda aumento da expressão de p53 (MEDINA, 1997). Ainda não foi demonstrado que o HMB possui ação similar ao butirato. Esta hipótese já está sendo investigada em nosso laboratório.

HMB é efetivo na manutenção da massa magra evitando mecanismos de degradação protéica devida à perda de peso induzida pelo câncer (SMITH *et al.*, 2004). Neste estudo o autor postula que o HMB parece exercer efeito redutor sobre a degradação da proteína I $\kappa$ B- $\alpha$  que acontece pela via ubiquitina proteossoma, estimulada pelo fator indutor da proteólise (PIF). O HMB inibe a proteína quinase C (PKC) resultando na estabilização citoplasmática do complexo I $\kappa$ B/ NF $\kappa$ B. O fator de transcrição NF- $\kappa$ B (FIGURA 12), uma vez liberado de sua proteína inibitória I $\kappa$ B- $\alpha$ , que estava interferindo na sua seqüência de localização nuclear, segue para o núcleo onde regula a transcrição de diversos genes para citocinas, fatores de crescimento, moléculas de adesão celular e proteínas pró- e anti-apoptóticas (VIATOUR *et al.*, 2005; ESCÁRCEGA, 2007). HMB numa dose de 50  $\mu$ mol/L *in vitro* atenuou efetivamente a degradação de I $\kappa$ B- $\alpha$  na presença de PIF, em miotubos e preveniu o movimento de NF- $\kappa$ B para o núcleo (SMITH *et al.*, 2004). O ácido eicosapentaenóico (EPA) é um reconhecido inibidor de degradação protéica, e o HMB tem sido comparado a este composto (SMITH *et al.*, 2005). Neste estudo o autor demonstra que ambos HMB e EPA reduzem a degradação muscular através da inibição de expressão das subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  da porção 20S do proteossoma e da proteína p42 da porção 19S, inibindo assim degradação de I $\kappa$ B- $\alpha$ . Portanto, o HMB pode estar agindo via PKC também, intervindo na proliferação das células tumorais, reduzindo a taxa de crescimento tumoral e os sintomas da caquexia.



**FIGURA 12** – Ativação da via de sinalização do fator de transcrição nuclear kB (NFκB) em célula tumoral. IκB- proteína inibitória de NFκB; Ub- ubiquitina.

Associada a estas recentes hipóteses está a já comprovada ação do HMB como imunoestimulador. Em estudos *in vivo* do HMB sobre macrófagos e linfócitos obtidos de peixes “truta arco-íris”, foi demonstrado haver aumento da função destas células melhorando a habilidade do organismo em lutar contra doenças e resistir a infecções (NISSEN *et al.*, 1996; SIWICKI *et al.*, 2000; SIWICKI *et al.*, 2003). Em animais como porcos, frangos e peixes o HMB teve efeitos positivos notáveis na função do sistema imunitário (NISSEN *et al.*, 1994, OSTASZEWSKI *et al.*, 2000, PETERSON *et al.*, 1999, SIWICKI *et al.*, 2000 e 2004). Nunes (2005) evidenciou que a suplementação de 76mg/kg/dia, em ratos portadores de tumor de Walker 256, teve efeito positivo nos parâmetros relacionados às capacidades citotóxicas dos macrófagos peritoneais e células polimorfonucleares sanguíneas (PMN). O possível aumento nesta capacidade citotóxica das células imunitárias promovida pelo HMB e ainda a possível ação direta sobre as células tumorais foram responsáveis pela redução da taxa de crescimento tumoral nos animais suplementados neste estudo.

O treinamento físico (EXW) foi capaz de reduzir a taxa de crescimento tumoral (FIGURA 6), o que corrobora achados anteriores (LEUNG, 2004; ZIELINSKI,

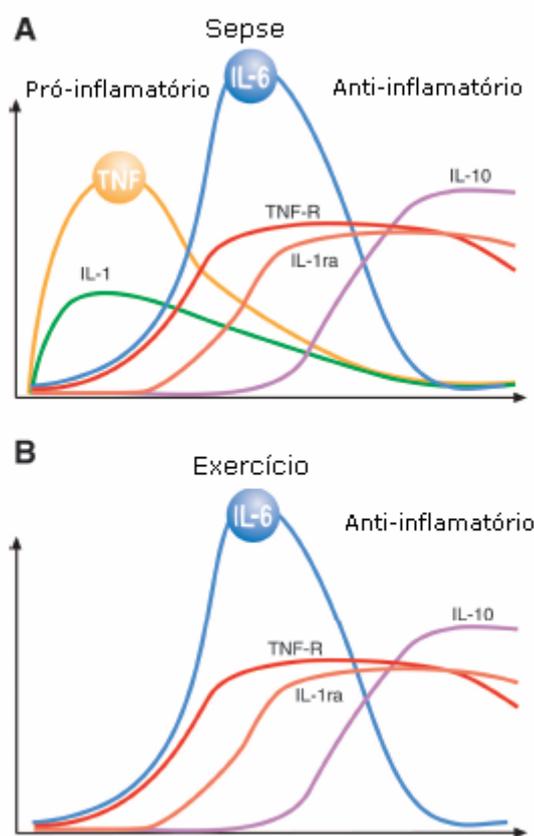
2004). Curiosamente, a prática de atividade física causou o mesmo fenômeno observado pela suplementação com HMB. Nos estudos utilizando atividade aeróbia têm sido relatada ação anti-tumoral, tal qual ocorrida em nosso exercício anaeróbio, contudo os aeróbios são mais eficazes em serem anti-caquéticos (MCNEELY, 2006). Várias hipóteses podem ajudar a explicar estes achados. Uma possível seria o aumento de irrigação nos músculos exercitados, que como consequência propiciariam maior captação de glicose pela musculatura esquelética e, portanto, competição com o tumor pelos nutrientes. Esta hipótese faz analogia com o trabalho de Fernandes *et al.*, (1991) que ao tratarem ratos com tumor de Walker 256 com o principal hormônio anabólico insulina, sugeriram que o hormônio promovia competição pelo nutriente glicose, uma vez que o tumor de Walker 256 não depende de insulina para captar glicose. Outra possibilidade seria que, durante a atividade física, vários radicais livres são produzidos, os quais poderiam levar a morte das células tumorais pois o tumor de Walker tem baixa proteção contra radicais livres. Neste sentido, ao examinarmos a taxa de lipoperoxidação (FIGURA 11), onde não encontramos alteração na mesma, significa que a menor taxa de crescimento tumoral não pode ser explicada por este mecanismo. Aventamos como próximos passos a serem considerados para responderem estes achados a participação dos eicosanóides, das caspases, apoptose e/ou necrose, entre outros.

Para explicar o fato da ação benéfica da atividade física, ainda a hipótese do gasto energético tem recebido mais atenção. De acordo com essa abordagem, o exercício influenciaria positivamente o organismo portador de tumor devido a um aumento do gasto energético. O gasto excessivo de energia dificultaria o desenvolvimento e crescimento tumoral uma vez que o organismo ao consumir mais substratos apresentaria uma vantagem contra o tumor na competição por nutrientes (BACURAU, 1997). A musculatura esquelética é o principal sítio de utilização de glicose estimulado pela insulina e o transporte desta é um passo limitante. A principal isoforma de transporte de glicose no músculo é o GLUT4 com concentrações menores também presentes de GLUT1, GLUT3 e GLUT5. Sob condições basais o GLUT4 está em estado quiescente em vesículas citoplasmáticas. Quando se realiza atividade física ou a insulina liga-se ao seu receptor de

membrana, ocorre uma série de alterações intracelulares que recrutam estas vesículas contendo GLUT4 para a membrana celular (Jessen and Goodyear, 2005). Aqui, o músculo em exercício anaeróbico, que utiliza o sistema glicolítico para a rápida produção de ATP, seria então ávido competidor. Porém, apesar de muito estudada alguns pesquisadores não acreditam que o principal efeito do exercício decorra deste mecanismo de gasto de energia (HOFFMAN-GOETZ, 1994). A dificuldade no estabelecimento preciso da relação entre atividade física e resistência ao câncer não é surpreendente, devido à extensa diversidade de tipos de câncer e de seus processos de iniciação, progressão e metástase, assim como à diversidade de alterações provocadas pela atividade física.

Sabe-se que o exercício regula o eixo neuroimunoendócrino, aumentando a sobrevivência e a qualidade de vida de pacientes com câncer (COSTA ROSA, 2004). Neste estudo o autor advoga sobre a hipótese da ação do exercício sobre a glutamina. A glutamina é um aminoácido essencial “condicional” que compõe 20% do total de aminoácidos plasmáticos e é produzida por diferentes órgãos incluindo a musculatura esquelética, esta que é o maior produtor deste aminoácido e dispõe altas taxas dele na corrente sanguínea (NEWSHLOME *et al.*, 1994 e 1996). A glutamina é essencial para a divisão e proliferação rápida de células do sistema imunitário como linfócitos e macrófagos, utilizando grande quantidade do aminoácido, mesmo em estado quiescente, sendo assim essencial para a regulação do sistema de defesa. A demanda do músculo e outros órgãos pela glutamina durante exercício intenso, ou após cirurgias, traumas, queimadura e outras doenças acarreta um débito da glutamina fornecida pelo sistema imunitário que pode temporariamente ter sua função afetada (PARRY-BILLINGS *et al.*, 1989, 1990 e 1992). Pesquisas mostraram as duas formas de resposta da glutamina durante o exercício: exercício de curta duração resulta em aumento da concentração da glutamina plasmática (POORTMANS *et al.*, 1974), enquanto que após uma maratona esta concentração cai em até 25% (CASTELL *et al.*, 2003). Assim é possível que o exercício de intensidade moderada poderá garantir constante concentração de glutamina plasmática sendo benéfica durante condições como caquexia oncológica (COSTA ROSA, 2004).

O exercício pode ser descrito como um tratamento anti-inflamatório, que segundo Petersen (2007) pode ser mediado pela citocina IL-6 derivada do músculo, a *Miocina*. A FIGURA 13 mostra como a resposta das citocinas ao exercício difere da resposta a infecções severas. Em infecção geral grave do organismo a cascata de resposta de citocinas consiste de (em ordem) TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-1ra, sTNF-R e IL-10. As duas primeiras desta seqüência são produzidas localmente e tem característica pró-inflamatória. Concentrações fisiológicas de IL-6 estimulam o aparecimento na circulação das citocinas anti-inflamatórias IL-1ra e IL-10, porém inibe a produção da citocina pro-inflamatória TNF- $\alpha$ . A IL-6 é liberada a partir do músculo durante o exercício enquanto que este não é o caso da TNF- $\alpha$ . O aumento da IL-6 plasmática está diretamente relacionada com a intensidade do exercício, duração, a massa muscular recrutada e a capacidade de endurance (FEBBRAIO *et al.*, 2002; PEDERSEN 2001 e 2003). Mesmo em exercícios moderados há um grande efeito na liberação da IL-6 muscular. Indivíduos jovens saudáveis praticaram 3h de extensão de joelhos das duas pernas a 50% da sua capacidade de força máxima individual e numa faixa de frequência cardíaca moderada (113 -122 bpm), mas isto foi capaz de induzir o aumento do RNAm de IL-6 em 16 vezes e aumentou em 20 vezes a IL-6 plasmática (FISCHER *et al.*, 2004). Quando o mesmo modelo, com mesma intensidade relativa à idade, foi aplicado em idosos saudáveis sedentários, o mesmo aumento de IL-6, liberada a partir da musculatura ativada, foi observado (PEDERSEN, *et al.*, 2004). Assim, o exercício neste estudo pode ter contribuído para a redução de citocinas pró-inflamatórias a partir da liberação da IL-6 muscular, conseqüentemente reduzindo a facilidade de crescimento da massa tumoral.



**FIGURA 13** – Cascatas de citocinas liberadas na inflamação e exercício físicos. Na infecção, sepsis (A), a cascata de citocinas nas primeiras horas consiste de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-1ra, sTNF-R e IL-10. A resposta aguda das citocinas ao exercício (B) não inclui TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , mas mostra marcado aumento em IL-6, esta que é seguida por IL-1ra, TNF-R e IL-10. (Petersen *et al.*, 2005, adaptado).

Leung *et al.*, (2004), mostrou redução de 27% do crescimento tumoral e significativa apoptose das células tumorais de pacientes com câncer de próstata, submetidos a exercício físico moderado a intenso e, associou este resultado ao aumento da proteína p53 na sinalização no interior destas células. A proteína p53 eleva a concentração das proteínas pró-apoptóticas Bax e Bcl-2, levando à apoptose das células tumorais. Observando a FIGURA 6 vemos que não houve efeito aditivo na redução do crescimento tumoral quando associada à suplementação ao exercício. É sabido que o butirato eleva as concentrações de p53 nas células

tumorais (MEDINA *et al.*, 1997). Se o HMB tiver ação (ainda não comprovada) similar à do butirato, então a suplementação e o exercício moderado a intenso estariam agindo na taxa de crescimento tumoral através da mesma via pró-apoptótica de p53.

O estabelecimento da caquexia é detectado pela presença de hipoglicemia, hiperlactacidemia, hipertriacilglicerolemia, redução do conteúdo de glicogênio muscular e hepático, e redução da massa corporal (PINTO *et al.*, 2004). O metabolismo basal do paciente com cânceres malignos é aumentado em 50% (CAMPS *et al.*, 2006) e isto não é compensado devido à baixa ingestão alimentar, anorexia, além do comportamento “egoísta” do tumor em crescimento, onde toda energia do portador é utilizada para seu crescimento, tudo isso levando à depleção dos estoques de energia que o organismo possui. Nossos resultados configuram um quadro caquético nos indivíduos demonstrando baixa glicemia plasmática, baixo conteúdo de glicogênio hepático, alta lactacidemia e triacilglicerolemia plasmáticos (TABELA 2).

Uma vez que o treinamento e o HMB, isoladamente, têm capacidade de reduzir a taxa de crescimento tumoral e caquexia, levantamos a hipótese de que a combinação de ambos poderia ter efeito aditivo ou mesmo potencializador sobre o crescimento tumoral e caquexia. De fato, a combinação destas duas estratégias não causou nenhum dos efeitos hipotetizados (TABELA 2). A suplementação e o exercício físico proposto neste estudo contribuíram para que a taxa de glicose sanguínea fosse maior que do grupo controle SW em pouco mais que 25%. Porém a associação dos dois procedimentos nos animais não teve efeito aditivo sobre a glicemia. (FIGURA 7). Taxa elevada de consumo de glicose é uma das principais características do tumor sólido, com finalidade de suprir suas necessidades energéticas. Tumores sólidos muito grandes tendem a ter um suprimento sanguíneo pobre e conseqüentemente hipoxia, e neste caso a glicose se torna o substrato metabólico predominante para a produção anaeróbica de ATP (WATERHOUSE, 1971). Conseqüentemente a gliconeogênese hepática é estimulada na tentativa de manter os níveis normais de glicose plasmática, isto que é corroborado com os dados apresentados na FIGURA 9, onde os grupos sedentários portadores de tumor

(SW, SHW) apresentam taxa significativa de redução no conteúdo de glicogênio hepático quando comparados aos grupos sem tumor (S, SH). Interessantemente, os grupos portadores de tumor exercitados tiveram menor conteúdo de glicogênio comparado aos grupos sedentários S e SH ( $p < 0,05$ ), mas não quando comparados aos grupos exercitados EX e EXH ( $p > 0,05$ ).

Dando seqüência as alterações no ciclo de cori causadas pelo tumor, altas taxas de concentração de lactato plasmático foram encontradas nos animais portadores de tumor neste estudo. Todos os animais sem tumor e os portadores de tumor suplementados e/ou exercitados tiveram uma concentração 52% menor que os animais portadores de tumor SW que não foram submetidos a tratamento algum ( $p < 0,05$ ). Corroborando com o estudo de Nunes (2005), a suplementação de HMB e o exercício de saltos contra-resistido foram eficientes em reduzir a concentração plasmática de lactato produzida pelo tumor, e ainda similar ao estudo de Minuzzi (2006), onde o mesmo protocolo de exercício de saltos foi utilizado. O exercício de força tem a propriedade de aumentar a captação e o transporte de glicose na musculatura esquelética, adaptações estas restritas aos músculos recrutados na atividade proferida (YASPELKIS *et al.*, 2002). No estudo de Pessini (2003), ratos foram submetidos ao mesmo protocolo de exercício de força utilizado neste estudo e, a concentração aguda de lactato sanguíneo foi de média de 14 mmol/L, mostrando quão alta é a atividade glicolítica dos músculos para produção de ATP neste exercício. Neste mesmo estudo a concentração aguda de lactato sanguíneo em animais suplementados com HMB foi de 10 mmol/L, indicando ação significativa da suplementação de HMB na redução da acidose metabólica induzida pelo exercício extenuante. E similar ao estudo de Caperuto (2006), a suplementação com HMB, *per se*, foi eficiente em reduzir a liberação de lactato no plasma, produzido a partir da atividade tumoral ( $p < 0,05$ ).

## 6.0 CONCLUSÃO

A suplementação com  $\beta$ -hidroxi- $\beta$ -metilbutirato (HMB) na dose de 76mg/kg/dia e o treinamento de força em meio aquático, isoladamente, foram capazes de reduzir a taxa de crescimento tumoral em ratos portadores do tumor de Walker 256. Porém ao associar os dois tratamentos não houve efeito aditivo, o que pode indicar a mesma via de ação. Nos parâmetros que indicam instalação de quadro caquético, a suplementação e o exercício, isoladamente, foram eficazes em manter níveis normais das taxas de glicemia e lactacidemia. A recuperação do glicogênio hepático foi somente providenciada pelo exercício enquanto que a triacilglicerolemia foi reduzida somente na ação conjunta da suplementação com o exercício físico.

Portanto conclui-se que a suplementação com HMB e o exercício de força, sem efeitos aditivos quando associados, têm efeito anti-tumoral, sendo de importante contribuição para a recuperação de indivíduos portadores da caquexia oncológica.

## 7.0 REFERÊNCIAS

AGOSTINO, D.; CLIFFTON, E.E. The growth of the carcinosarcoma of Walker 256 in the ascitic form. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.24, p. 166-167, 1968.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. **Biologia molecular da célula**. 3ªed., Artmed, Porto Alegre, 1997.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Fundamentos de biologia celular: uma introdução à biologia molecular da célula**. Artmed, Porto Alegre, 1999.

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, 2001.

ANTHONY, J. C; REITER, A. K; ANTHONY, T.G; CROZIER, S. J; LANG, C.H; MacLEAN, D.A; KIMBALL, S. R; JEFFERSON,L. S. Orally Administered Leucine Enhances Protein Synthesis in Skeletal Muscle of Diabetic Rats in the Absence of Increases in 4E-BP1 or S6K1 Phosphorylation. *In press*. **Pennsylvania State University College of Medicine**, Pennsylvania, 2001.

ARGILÉS, J.M.; LOPES-SORIANO, F.J. The oxidation of leucine in tumour-bearing rats. **Biochem. J.** 268, 241-244, 1990.

ARGILÉS, J.M.; LOPES-SORIANO, F.J. The Energy State of Tumor-bearing Rats. **The American Society for Biochemistry and Molecular Biology**, Vol. 266:5, Issue: 15, pp. 2978-2982, 1991.

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

ARGILÉS, J.M. Cancer-associated malnutrition. **European Journal of Oncology Nursing** 9, S39–S50, 2005a.

ARGILÉS, J.M; BUSQUETS S.; GARCÍA-MARTÍNEZ, C.; LÓPEZ-SORIANO, F.J. Mediators involved in the cancer anorexia-cachexia syndrome: past, present, and future. **Nutrition** 21, 977–985, 2005b.

BACURAU, R.F.P.; COSTA ROSA, L.F.B.P.; Efeitos do exercício sobre a incidência e desenvolvimento do câncer. **Rev. Paul. Educ. Fís.**, São Paulo, 11(2):142-47, 1997.

BACURAU, R.F.P.; BELMONTE, M.A.; SEELAENDER, M.C.L.; COSTA ROSA, L.F.B.P. Effect of a moderate intensity exercise training protocol on the metabolism of macrophages and lymphocytes of tumor-bearing rats. **Cell Biochem. Funct.** 18:249-258, 2000.

BARACOS, V.E.; DEVIVO, C.; HOYLE, D. H.; GOLDBERG, A. L. Activation of the ATP-ubiquitin-proteasome pathway in skeletal muscle of cachectic rats bearing a hepatoma. **Am J Physiol Endocrinol Metab** 268: E996-E1006, 1995.

BARACOS, V.E. Management of muscle wasting in cancer-associated cachexia. **Cancer**. 92:1669-1677, 2001.

BAAR K.; BLOUGH E.; DINEEN B.; ESSER K. Transcriptional regulation in response to exercise. **Exerc Sport Sci Rev.** 27:333-79, 1999.

BATTAGLINI, C.L; BOTTARO, M; CAMPBELL, J.S; NOVAES, J; SIMÃO, R. Atividade Física e níveis de fadiga em pacientes portadores de câncer. **Universidade Gama Filho – CEPAC – RJ**, 2004.

BEHNKE, A. R. & WILMORE, J. H. Evaluation and Regulation of Body Build and Composition. **Englewood Cliffs**, Prentice Hall, 1974.

BERENBLUM I., TRAININ N. Possible Two-Stage Mechanism in Experimental Leukemogenesis. **Science**, 132: 3418, pp. 40 – 41, 1960.

BERENBLUM I.; SHUBIK P. A new quantitative approach to the study of the stages of chemical carcinogenesis in the mouse's skin. **British Journal of Cancer** 1 384-391, 1947.

BOLSTER D.R.; VARY T.C.; KIMBALL S. R.; JEFFERSON L.S. Leucine Regulates Translation Initiation in Rat Skeletal Muscle Via Enhanced eIF4G Phosphorylation. **J. Nutr.** 134:1704-1710, 2004.

BONNOTTE B.; FAVRE N.; REVENEAU S.; MICHEAU O.; DROIN N.; GARRIDO C.; FONTANA A.; CHAUFFERT B.; SOLARY E.; MARTIN F. Cancer cell sensitization to fas-mediated apoptosis by sodium butyrate. **Cell Death Differ**; 5: 480-487, 1998.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem.** 72:248-254, 1976.

BRUERA, E. ABC of palliative care: Anorexia, cachexia, and nutrition. **British Medical Journal**, v. 315, p. 1219-1222, 1997.

CASTELL L. Glutamine supplementation in vitro and in vivo, in exercise and immunodepression. **Sports Med**;33:323-45, 2003.

CAMPS C.; IRANZO V.; BREMNES R.M.; SIRERA R. Anorexia-Cachexia syndrome in cancer: implications of the ubiquitin-proteasome pathway. **Support Care Cancer** 14: 1173-1183, 2006.

CAPERUTO, E.C.; TOMATIELI, R.V.; COLQUHOUN, A.; SEELAENDER, M.C.L.; COSTA ROSA, L.F.B.P.  $\beta$ -Hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate supplementation affects Walker 256 tumor-bearing rats in a time-dependent manner. **Clinical Nutrition**, 26, 117-122, 2007.

COMPTON, S.J.; JONES, C.G. Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. **Annals of Biochemistry**, 151, 369-374, 1985.

COSTA ROSA, L.F.B.P. Exercise as a Time-conditioning Effector in Chronic Disease: a Complementary Treatment Strategy. **eCAM**. 1(1)63-70, 2004.

COURNEYA, K.S.; SEGAL, R.J.; REID, R.D.; JONES, L.W.; MALONE, S.C.; VENNER, P.M.; PARLIAMENT, M.B.; SCOTT, C.G.; QUINNEY, H.A.; WELLS, G.A. Three independent factors predicted adherence in a randomized controlled trial of resistance exercise training among prostate cancer survivors. **J Clin Epidemiol**. 57(6):571-9, 2004.

CREW T.E.; ELDER D.J.E.; PARASKEVA C. A cyclooxygenase-2 (COX-2) selective non-steroidal anti-inflammatory drug enhances the growth inhibitory effect of butyrate in colorectal carcinoma cells expressing COX-2 protein: regulation of COX-2 by butyrate. **Carcinogenesis**, Vol. 21, No. 1, 69-77, 2000.

DEMPKE W, RIE C, GROTHEY A, SCHMOLL HJ. Cyclooxygenase-2: a novel target for cancer chemotherapy. **J Cancer Res Clin Oncol**;127:411-7, 2001.

DERMAN W.E; COLEMAN K.L; NOAKES T.D. Effects of exercise training in patients with cancer who have undergone chemotherapy. Abstracted. **Med Sci Sports Exerc**;31(5):S368;1999.

DORMANDY, TL. An approach to free radicals. **Lancet**, II, p. 1010-4, 1983.

DURAK E.P.; LILLY P.C.; HACKWORTH J.L. Physical and psychosocial responses to exercise in cancer patients: a two-year follow-up survey with prostate, leukemia, and general carcinoma. **J Exerc Phys**;21:1-7; 1999.

EARLE, E.R. A study of the Walker rat mammary carcinoma 256, in vitro and in vivo. **American Journal Cancer**, v. 24, p. 566-612, 1935.

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.

ESCARCEGA, R.O.; FUENTES-ALEXANDRO, S.; GARCIA-CARRASCO, M.; GATICA, A.; ZAMORA, A. The transcription factor nuclear factor-kappa B and cancer. **Clinical oncology**. 19(2):154-61, 2007.

FARRELL, P.A.; FEDELE, M.J.; VARY, T.C.; KIMBALL, S.R.; LANG, C.H.; JEFFERSON, L.S. Regulation of protein synthesis after acute resistance exercise in diabetic rats. **Am J. Physiol. Endocrinol. Metab**. 276:E721-E727, 1999.

FARRELL, P.A.; HERNANDEZ, J.M.; FEDELE, M.J.; VARY, T.C.; KIMBALL, S.R.; JEFFERSON, L.S. Eukaryotic initiation factors and protein synthesis after resistance exercise in rats. **J. Appl. Physiol**. 88:1036-1042, 2000.

FEBBRAIO M.A.; PEDERSEN, B.K. Muscle-derived interleukin-6: mechanisms for activation and possible biological roles. **FASEB J**. 16: 1335-1347, 2002.

FEBBRAIO M.A.; STEENBERG A.; KELLER C.; STARKIE R.L.; KRUSTRUP P.; OTT P.; SECHER N.H.; PEDERSEN B.K. Glucose investment attenuates interleukin-6 release from contracting skeletal muscle in humans. **J Physiol** 549: 607 – 612, 2003.

FERNANDES, L.C.; MACHADO, U.F.; NOGUEIRA, C.R.; CARPINELLI, A.R.; CURI, R. Insulin secretion in Walker 256 tumor cachexia. **Am. J. Physiol**. 258:E1033-1036, 1990.

FERNANDES, L.C.; CARPINELLI, A.K.; HELL, N.S.; CURI, R. Improvement of cancer cachexia and inhibition of tumor growth by insulin administration in rats. **Cancer Ther. Control**. 1:259-268, 1991.

FERNANDES, L.C. Alterações metabólicas causadas pelo tumor de Walker 256 no músculo esquelético, linfócitos e macrófagos de ratos. **Tese de Doutorado, USP**, São Paulo, 1995.

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.

FISCHER C.P.; HISCOCK N.J.; PENKOWA M.; BASU S.; VESSBY B.; KALLNER A.; SJOBERG L.B.; PEDERSEN B.K. Supplementation with vitamins C and E inhibits the release of interleukin-6 from contracting human skeletal muscle. **J Physiol** 558: 633–645, 2004.

FOSCHINI, R.M.S.A.; RAMALHO, F.S.; BICAS, H.E.A. Células satélites musculares. **Arq Bras Oftalmol** 67 (4): 681-7, 2004.

GALLAGHER, P.M.; CARRITHERS, J.A.; GODARD, M.P.; SCHULZE, K.E.; TRAPPE, S.W.  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate ingestion, Part I: effects of strength and fat free mass. **Med. Sci. Sports Exerc.**, Vol. 32, No. 12, pp. 2109–2115, 2000a.

GALLAGHER, P.M.; CARRITHERS, J.A.; GODARD, M.P.; SCHULZE, K.E.; TRAPPE, S.W.  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate ingestion, Part II: effects on hematology, hepatic and renal function. **Med. Sci. Sports Exerc.**, Vol. 32, No. 12, pp. 2116–2119, 2000b.

GOLL, D.E.; THOMPSON, V.F.; TAYLOR, R.G.; CHRISTIANSEN, J.A. Role of the calpain system in muscle growth. **Biochemie**. 74:225, 1992.

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

GRUNE, T.; BLASIG, I.E.; SITTE, N.; ROLOFF, B.; HASELOFF, R.; DAVIES, K. Peroxynitrite increases the degradation of aconitase and other cellular proteins by proteasome. **J. Biol. Chem.** 273(18):10857-10862, 1998.

HÄMÄLÄINEN, N.; PETTE D. The Histochemical Profiles of Fast Fiber Types IIB, ID, and IIA in Skeletal Muscles of Mouse, Rat, and Rabbit. **The Jowd of Histochemistry and Cytochemistry**, 41:1. pp. 733-743, 1993.

HARVIE, M.N.; CAMPBELL, I.T.; BAILDAM, A.; HOWELL, A. Energy balance in early breast cancer patients receiving adjuvant chemotherapy. **Breast Cancer Res Treat.** 83(3):201-10, 2004.

HASSELGREN, P; FISCHER, J.E. Muscle cachexia: current concepts of intracellular mechanisms and molecular regulation. **Annals of Surgery**, 233:1, p. 9-17, 2001.

HASSIG, C.A.; TONG, J.K.; SCHREIBER, S.L. Fiber-derived butyrate and the prevention of colon cancer. **Chem Biol**. 4(11):783-9, 1997.

HORROBIN, D.F. Loss of n-6 desaturase activity as a key role factor in ageing. **Age**. V.4, p 139, 1981.

JESSEN, N.; GOODYEAR, L.J. Contraction signaling to glucose transport in skeletal muscle. **J Appl Physiol**, v. 99, n. 1, p.330-337, 2005.

KADI, F. Adaptation of human skeletal muscle to training and anabolic steroids. **Acta Physiol. Scand**. 168: 646, 2000.

KIRSCHENBAUM A, LIU X.H.; YAO S.; LEVINE A.C. The role of cyclooxygenase-2 in prostate cancer. **Urology**. 58:127–31, 2001.

LECKER, S.H.; SOLOMON, V.; MITCH, W.E.; GOLDBERG, A.L. Muscle protein breakdown and the critical role of the Ubiquitin-Proteasome pathway in normal and disease states. **J. Nutr**. 129:227S-237S, 1999.

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

LLOVERA, M.; CARBÓ, N.; LÓPEZ-SORIANO, J.; GARCIA-MARTÍNEZ, C.; BUSQUETS, S.; ALVAREZ, B.; AGELL, N.; COSTELLI, P.; LÓPEZ-SORIANO, F.J.;CELADA, A.; ARGILÉS, J.M. Different cytokines modulate ubiquitin gene expression in rat skeletal muscle. **Cancer Letters**. 133:83-87, 1998a.

LLOVERA, M.; GARCIA-MARTÍNEZ, C.; LÓPEZ-SORIANO, J.; CARBÓ, N.; AGELL, N.; LÓPEZ-SORIANO, F.J.; ARGILÉS, J.M. Role of TNF receptor 1 in protein turnover during cancer cachexia using gene knockout mice. **Mol. Cell. Endocrinol**. 142:183-189, 1998b.

MANDAL M.; OLSON D.J.; SHARMA T.; VADLAMUDI R.K.; KUMAR R. Butyric Acid Induces Apoptosis by Up-regulating Bax Expression via Stimulation of the c-Jun N-Terminal Kinase/Activation Protein-1 Pathway in Human Colon Cancer Cells. **Gastroenterology**, 120:1, pp 71-78 M, 2001.

MAY P.E.; BARBER A.; D'OLIMPIO J.T.; HOURIHANE A.; ABUMRAD N.N. Reversal of cancer-related wasting using oral supplementation with a combination of  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate, arginine, and glutamine. **Amer J of Surgery**, vol. 183, no. 4, pp. 471-479(9), 2002.

McARDLE, W.D.; KATCH, F.I.; KATCH, V.L. **Fisiologia do Exercício – Energia, Nutrição e Desempenho Humano**. 5ªed, Guanabara koogan, 2003.

McNEELY M.L, CAMPBELL K.L, ROWE B.H *et al.*, Effects of exercise on breast cancer patients and survivors: a systematic review and meta-analysis. **Canadian Medical Association Journal**, Jul 4;175(1):34-41, 2006.

MEDINA V.; EDMONDS B.; YOUNG G.P.; JAMES R.; APPLETON S.; ZALEWSKI P.D. Induction of caspase-3 protease activity and apoptosis by butyrate and trichostatin A (inhibitors of histone deacetylase): dependence on protein synthesis and synergy with a mitochondrial/cytochrome c-dependent pathway. **Cancer Res**; **57**: 3697-3707, 1997.

MEGENEY, L.A.; KABLAR, B.; GARRETT, K.; ANDERSON, J.E.; RUDNICKI, M.A. MyoD is required for myogenic stem cell function in adult skeletal muscle. **Genes Dev**.15:1173-1183, 1996.

MINUZZI, L.G. Estudo da associação do exercício físico e da suplementação com óleo de peixe sobre crescimento tumoral, caquexia e imunidade em ratos com tumor de Walker 256. **Dissertação** (Obtenção do título de mestre em Educação Física – Fisiologia da Performance). UFPR, Curitiba-PR, 2006.

MITCH, W.E; CLARK, A.S; Specificity of the effects of leucine and its metabolites on protein degradation in skeletal muscle. **Biochem. J**. 222: 579–586,1984.

NEWSHOLME E.A. Biochemical control logic and the metabolism of glutamine. **Nutrition**;10:178–9, 1994.

NEWSHOLME E.A. The possible role of glutamine in some cells of the immune system and the possible consequence for the whole animal. **Experientia**; 52:455–9, 1996.

NIEMAN, D.C.; COOK, V.D.; HENSON, D.A.; SUTTLES, J.; REJESKI, W.J.; RIBISL, P.M.; FAGOAGA, O.R.; NEHLSSEN-CANNARELLA, S.L. Moderate exercise training and natural killer cell cytotoxic activity in breast cancer patients. **Int. J. Sports Med.** 16:334-337, 1995.

NISSEN, S.; MORRICAL, D.; FULLER, J. C. The effects of the leucine catabolite  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate on the growth and health of growing lambs. **J. Anim. Sci.** 77:243, 1994.

NISSEN, Steven L; SHARP, Rich; RAY, M. Effect os leucine metabolite  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate on muscle metabolism during resistance-exercise training. **J Appl Physiol**, v.81, p. 2095-2104, 1996.

NISSEN, Steven L; ABUMRAD, Naji N. Nutricional role of the leucine metabolite  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate (HMB), **Nutricional Biochemistry** 8: 300-311, 1997.

NISSEN, R.L.S.; PANTON, L.; VUKOVICH, M.; TRAPPE, S., FULLER, J.  $\beta$ -hidroxy- $\beta$ -methylbutyrate (HMB) supplementation in humans is safe and may decrease cardiovascular risk factors. **Journal of Nutrition**. V.130. p 1937-1945, 2000.

NISSEN, Steven L; SHARP, Rich. Effect of dietary supplements on lean mass and strength gains with resistance exercise: A meta-analysis. **J Appl Physiol**, 00755-October 25, 2002.

NUNES, E.A. Efeitos do treinamento de saltos e da suplementação com  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate (HMB) sobre o crescimento tumoral, caquexia e parâmetros

imunitários de ratos portadores do tumor de Walker 256. **Dissertação** (Obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular), UFPR, Curitiba-PR, 2005.

OSTASZEWSKI, P.; KOSTIUK, S.; BALASINSKA, M.; JANK, M.; PAPET, I.; GLOMOT, F. The leucine metabolite 3-hydroxy-3methylbutyrate (HMB) modifies protein turnover in muscles of laboratory rats and domestic chickens *in vitro*. **J. Anim. Physiol and Anim Nutr.** 84: 1-8, 2000.

OUBENOFF, R.; WILSON, I.B. Effect of resistance training on self-reported physical functioning in HIV infection. **Med Sci. Sports Exerc.** 33:1811-1817, 2001.

PARRY-BILLINGS M.; LEIGHTON B.; DIMITRIADIS G.; DE VASCONCELOS P.R.; NEWSHOLME E.A. Skeletal muscle glutamine metabolism during sepsis in the rat. **Int J Biochem;**21:419–23, 1989.

PARRY-BILLINGS M.; EVANS J.; CALDER P.C.; NEWSHOLME E.A.;. Does glutamine contribute to immunosuppression after major burns? **Lancet.** 336: 523–5, 1990.

PARRY-BILLINGS M.; BUDGETT R.; KOUTEDAKIS Y.; BLOMSTRAND E.; BROOKS S.; WILLIAMS C; *et al.*,. Plasma amino acid concentrations in the overtraining syndrome: possible effects on the immune system. **Med Sci Sports Exerc,** 24:1353–8, 1992.

PEDERSEN B.K.; STEENSBERG A.; SCHJERLING P. Muscle-derived interleukin-6: possible biological effects. **J Physiol** 536: 329–337, 2001.

PEDERSEN B.K.; STEENSBERG A.; FISCHER C.; KELLER C.; KELLER P.; PLOMGAARD P.; FEBBRAIO M.; SALTIN B. Searching for the exercise factor: is IL-6 a candidate. **J Muscle Res Cell Motil** 24: 113–119, 2003.

PEDERSEN M; STEENSBERG A; KELLER C; OSADA T; ZACHO M; SALTIN B; FEBBRAIO M.A.; PEDERSEN B.K. Does the aging skeletal muscle maintain its endocrine function? **Exerc Immunol Rev** 10: 42 – 55, 2004.

PEDERSEN, B. K.; AKERSTROM T.C.A.; NIELSEN A.R.; FISCHER C.P. Role of myokines in exercise and metabolism. **Journal of Applied Physiology**, *in press*. Março, 2007.

PESSINI, C. Efeitos da suplementação de  $\beta$ -hidroxi- $\beta$ -metilbutirato (HMB) sobre parâmetros bioquímicos e fisiológicos em ratos submetidos a treinamento anaeróbico. **Monografia** (Obtenção do título de licenciatura em Educação Física). UFPR, Curitiba-PR, 2003.

PETERSEN A.M.; PEDERSEN B. K. The anti-inflammatory effect of exercise. **J Appl Physiol** 98;1154-1162, 2005.

PETERSON A.L., QURESHI M.A., FERKET P.R., FULLER J.C. Enhancement of cellular and humoral immunity in young broilers by the dietary supplementation of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate. **Journal of Immunopharmacology And Immunotoxicology**, 21 (2): 307-330, 1999.

PIFFAR, P.M. ; FERNANDEZ, R.; TCHAIKOVSK J.O. ; HIRABARA, S.M.; FOLADOR, A.; JAKOBI, S.; GOBBOBORDON, D.; PINTO, G.J.; FABRÍCIO, T.V.; TOSTA, E.; CURI, R.; FERNANDES, L. C. . Naproxen, clenbuterol and insulin administration ameliorates cancer cachexia and reduce tumor growth in Walker 256 tumor-bearing rats.. **Cancer Letters**, v. 201, p. 139-148, 2003.

PINTO J. A., Jr; FOLADOR A., BONATTO S. J., AIKAWA J.; YAMAZAKI R.K. *et al.*,. Fish oil supplementation in F1 generation associated with naproxen, clenbuterol, and insulin administration reduce tumor growth and cachexia in Walker 256 tumor-bearing Rats. **Journal of Nutritional Biochemistry** 15: 358–365, 2004.

PIZATO, N.; BONATTO, S.; YAMAZAKI, R.K.; AIKAWA, J.; NOGATA, C.; MUND, R.C.; NUNES, E.A.; PICONCELLI, M.; NALIWAIKO, K.; CURI, R.; CALDER, P.C.; FERNANDES, L.C. Ratio of n-6 to n-3 fatty acids in the diet affects tumor growth and cachexia in Walker 256 tumor-bearing rats. **Nutr Cancer**.53(2):194-201, 2005.

POORTMANS J.R.; SIEST G.; GALTEAU M.M.; HOUOT O. Distribution of plasma amino acids in humans during submaximal prolonged exercise. **Eur J Appl Physiol Occup Physiol**;32:143–7, 1974.

PRESCOTT, S.M.; FITZPATRICK, F. A. Cyclooxygenase-2 and carcinogenesis. **Biochimica et Biophysica Acta** 1470: M69-M78, 2000.

ROGATTO, G.P.; LUCIANO, E. Efeitos do treinamento físico intenso sobre o metabolismo de carboidratos. **Atividade Física & Saúde**, v.6, n.2, p.39-46, 2001.

ROUBENOFF, R.; McDERMOTT, a.; WEISS, L.; SURI, J.; WOOD, M.; BLOCH, R.; GORBACH, S. Short-term progressive resistance training increases strength and lean body mass in adults infected with human immunodeficiency virus. **AIDS**. 13:231-239, 1999.

SCHULTZ, K.H; SZLOVAK, C; SCHULTZ, H. Implementation and evaluation of an ambulatory exercise therapy based rehabilitation program for breast cancer patients. **Medical Psycho**;48:398-407; 1998.

SCHWARTZ, A.L. Fatigue mediates the effects of exercise on quality of life. **Qual Life Res**,8(6):529-538, 1999.

SIWICKI, A.K.; FULLER J.C.; NISSEN, S.; OSTASZEWSKI P.; STUDNICKA, M. In vitro effects of  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate (HMB) on cell-mediated immunity in fish. **J Immunopharm and Immunotoxic**, 2000.

SIWICKI, A.K.; FULLER J.C.; NISSEN, S.; MORAND, M; POZET, F; VINCENT, F; KAZUN, B. Effect of HMB ( $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate) on *in vitro* Proliferative Responses of Sheatfish (*Silurus glanis*) ad Catfish (*Ictalurus melas*) Lymphocytes stimulated by mitogens. **Acta Vet. BRNO**, 73: 119-122, 2004.

SMITH, S. Physical exercise as an oncology nursing intervention to enhance quality of life. **Oncol Nurs Forum**;2:771-8; 1996.

SMITH, H. J.; WYKE, S. M.; TISDALE, M. J. Mechanism of the Attenuation of Proteolysis-Inducing Factor Stimulated Protein Degradation in Muscle by  $\beta$ -Hydroxy- $\beta$ -Methylbutyrate **Cancer Res.** 64:8731-8735, 2004.

SMITH, H. J.; MUKERJI, P.; TISDALE M. J. Attenuation of Proteasome-Induced proteolysis in skeletal muscle by  $\beta$ -Hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate in cancer-induced muscle loss. **Cancer Res.** 65: 277-283, 2005.

STEVINSON C., FOX K.R. Feasibility of an exercise rehabilitation programme for cancer patients. **Eur J Cancer Care** 15 (4), 386–396, 2006.

TISDALE, M. J. Biology of Cachexia. **Journal of the National Cancer Institute**, Vol. 89, No. 23, December 3, 1997.

TISDALE, M. J. Metabolic Abnormalities in cachexia and anorexia. Abstract. **Nutrition**, v. 16, p. 1013-1014, 2000.

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

TISDALE, M. J. Cachexia in cancer patients. **Nature Reviews Cancer** 2, 862 –871, 2002.

TISDALE, M. J. Cancer cachexia. **Langenbecks Arch Surg**, 389:299-305, 2004.

TISDALE, M. J. The Ubiquitin-Proteasome Pathway as a Therapeutic Target for Muscle Wasting. **J Support Oncol**, 3:209–217, 2005.

TOGNI, V. ; OTA, C.C.; FOLADOR, A.; TCHAIKOVSKI JÚNIOR, O.; AIKAWA, J.; YAMAZAKI, R.K.; FREITAS, F.A. ; LONGO, R. ; MARTINS, E. F ; CALDER, P. C ; CURI, R. ; FERNANDES, L.C. Cancer cachexia and tumor growth reduction in Walker 256 tumor-bearing rats supplemented with n-3 polyunsaturated fatty acids for one generation. **Nutr and Cancer Intern J**, v. 46, n. 1, p. 52-58, 2003.

TODOROV, P.T.; FIELD, W.N.; TISDALE, M.J. Role of a proteolysis-inducing factor (PIF) in cachexia induced by a human melanoma (G361). **Br J Cancer**. 80(11):1734-1737, 1999.

TODOROV, P.T.; MCDEVITT, T.M.; CARIUK, P.; COLES, B.; DEACON, M.,TISDALE, M.J. Induction of muscle protein degradation and weight loss by a tumor product. **Cancer Res**. 15;56(6):1256-1261, 1996.

SMITH, H.J; MUKERJI, P; TISDALE, M.J. Attenuation of Proteasome-Induced Proteolysis in Skeletal Muscle by  $\beta$ -Hydroxy-  $\beta$  -Methylbutyrate in Cancer-Induced Muscle Loss. **Cancer Res** 2005; 65: (1). January 1, 2005.

VIATOUR, P.; MERVILLE, M.; BOURS, V.; CHARIOT, A.. Phosphorylation of NF-kB and I $\kappa$ B proteins: implications in cancer and inflammation. **Biochemical Sciences** Vol.30 No.1, 2005.

VIEIRA, R; HAEBISCH, H; KOKUBUN, E; HELL, N. S; CURI, R. – Sistema de Natação para Exercício Físico de Ratos. **Arq. Biol. Technol**. 31 (3): 387-394 – 1988.

VUKOVICH, M.D.; DREIFORT, G.D. - Effect of  $\beta$ -hydroxy  $\beta$ -methylbutyrate on the onset of blood lactate accumulation and  $VO_2$ peak in endurance-trained cyclists. **J Strength and Cond Res**, Vol. 15, No. 4, p. 491–497, 1997.

VUKOVICH, Matthew. D.; SLATER, Gary; MACCHI, Martina B; TURNER, Michael J; FALLON, Keiren; BOSTON, Tanya; RATHMACHER, John -  $\beta$ -Hydroxy- $\beta$ -Methylbutyrate (HMB) kinetics and the influence of glucose ingestion in humans. **J Nutr Biochem**, 12: 631-639, 2001a.

VUKOVICH, M. D.; STUBBS, N. B.; BOHLKEN, R. M. B. Body Composition In 70-Year-Old Adults Responds To Dietary  $\beta$ -Hydroxy- $\beta$ -Methylbutyrate Similarly To That Of Young Adults. **J. Nutr**. 131(7): 2049-2052, 2001b.

WATERHOUSE C, KEMPERMAN JH. Carbohydrate metabolism in subjects with cancer. **Cancer Res**;31:1273–8, 1971.

WHITEHOUSE, A.S.; SMITH, H.J.; DRAKE, J.L.; TISDALE, M.J. Mechanism of attenuation of skeletal muscle protein catabolism in cancer cachexia by Eicosapentanoic Acid. **Cancer Res.** 61:3604-3609, 2001.

WHO – World Health Organization (Organização Mundial da Saúde). Disponível em **[www.who.int/](http://www.who.int/)**. Acesso em 2007.

ZIELINSKI, M.R.; MUENCHOW, M.; WALLIG, M.A.; HORN, P.L.; WOODS, J.A.

Exercise delays allogeneic tumor growth and reduces intratumoral inflammation and vascularization. **J Appl Physiol.** 96(6):2249-56, 2004.