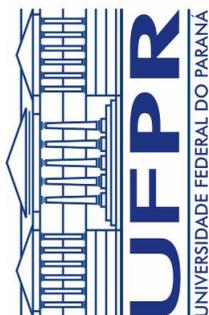


**SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE EDUCAÇÃO FÍSICA  
CURSO DE MESTRADO EM EDUCAÇÃO FÍSICA**

**LUCIÉLE GUERRA MINUZZI**

**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 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.



**CURITIBA  
2006**

**LUCIÉLE GUERRA MINUZZI**

**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 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

## AGRADECIMENTOS

Para a conclusão deste trabalho muitas pessoas foram presentes, acho que imprescindíveis. Tão importante quanto chegar à etapa final, foi a oportunidade de conhecer grandes amigos, amigos eternos.

Primeiramente gostaria de agradecer ao meu “chefe” Prof. Dr. Luiz Cláudio Fernandez pela orientação deste trabalho, pelo profissionalismo e amizade. Obrigada pela oportunidade de trabalhar neste laboratório, pela paciência, pelas críticas “construtivas” e por entender meus limites. Chefe, eu fiz o melhor que pude!

Aos meus pais (Jorge e Leonilda) pela força, incentivo constante e por abrirem mão dos seus sonhos para que pudesse buscar os meus. Ao meu irmão Lisandro e Liliane, pelo carinho.

Aos amigos do Laboratório de Metabolismo Celular da UFPR:

Maurício (Mau) e Ricardo (Rica Chairs): Vocês não tem idéia de quanto a amizade de vocês mudou meu caminho e fez com que eu realmente alcançasse o que esperava. Obrigada de coração pelo incentivo.

Rogéria, Evelise, Kátia, Ricardo Key e Júlia: obrigada pelo auxílio na realização dos protocolos no início dos meus experimentos.

Minhas amigas lindas, Cristina (Cris), Fabíola, Heloísa Helena (Loli) e Vanessa (Vanes), obrigada pelos conselhos, ensinamentos, baladas e por fazerem parte dessa fase tão importante da minha vida. Eu adoro vocês!

Aos meus grandes amigos Diogo (Di) e Gleisson pelas piadas, cervejas e por deixarem o mestrado mais feliz! Ah, e a Mica por deixar o Diogo feliz!

A galera geral do lab: André, Carina, Dalva, Fernanda, Gabi, Jana, Helô, Luiza, Mirna, e aos “emprestados” Daniel, Fabiano e Marcos, obrigada pelo companheirismo e por tudo que aprendi com vocês. Em especial ao Sandro e ao Sérgio por estarem sempre presentes e pelo auxílio constante nos experimentos.

Em especial:

Ao pessoal que auxiliou no treinamento e suplementação dos animais: Carine (Cá), Fabrício, Luciana (Lu), Marcelo, Norton e Paulo. Acho que agradecer ainda é muito pouco, pelo tanto que fizeram por mim e pelos ratinhos... afinal essa tarefa é árdua e só quem treina sabe como é... “Cá”, Lu e Marcelo MUITO OBRIGADA, pela amizade, gargalhadas e pela ajuda. Jamais vou esquecer vocês!

Ao amigo, parceiro (co-orientador...rs) Éverson. Obrigada por tudo que me ensinou e ajudou desde o primeiro dia que cheguei perdida no lab. Não é por nada que todo mundo te adora, mas pode ter certeza que não é somente por

você ser *essencial* para nós, mas pelo grande coração que você tem. Espero que ainda possa tirar muitas dúvidas com você!

À minha amigona Fernanda Trentin (Fer). Acho que eu nem preciso falar o quanto eu tenho que te agradecer... Acho que preciso sim! MUITO OBRIGADA! Sem esquecer da Bá, Ro e do Fernando.

À Débora Garrido, minha colega de trabalho. Obrigada por me escutar!

À família Trentin pelo carinho.

Aos professores Raul Osiecki, Reury Frank Bacurau e Paulo Ivo Homem de Bittencourt, pela atenção na leitura e sugestões ao trabalho.

À Universidade do Oeste de Santa Catarina, em especial aos Professores e colegas Clodoaldo de Sá, Andréa Ribeiro (Déia), Marcos Vieira e Michel Saad, obrigada pelo incentivo, pelos conselhos e por entenderem minhas ausências!

A Universidade Federal do Paraná, por possibilitar a execução deste trabalho. Aos funcionários do biotério pelo auxílio ao cuidado com os animais. E, aos ratinhos, sem vocês nada disso seria possível!

À todas as pessoas que de alguma forma estiveram presentes neste longo caminho!

**E finalmente, ao meu Dico! É difícil escrever tudo o que você significa pra mim. Mas é preciso agradecer o seu incentivo, sua força e companhia. Obrigada, por aturar meu mau-humor, por entender minha ausência e por nunca ter deixado de me amar.**

**SUMÁRIO**

<b>RESUMO</b> .....	9
<b>ABSTRACT</b> .....	10
<b>1 – INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>2 – JUSTIFICATIVA</b> .....	40
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	42
<b>4 – MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	43
<b>5 – RESULTADOS</b> .....	51
<b>6 – DISCUSSÃO</b> .....	64
<b>7 – CONCLUSÃO</b> .....	77
<b>8 – REFERÊNCIAS</b> .....	78

## LISTA DE ABREVIATURAS

AA: Ácido Araquidônico  
AGs: Ácidos Graxos  
AL: Ácido Linoléico  
ALA: Ácido Alfa-Linolênico  
AMP<sub>c</sub>: Adenosina monofosfato cíclica  
ATP: Adenosina trifosfato  
CAP: Célula apresentadora de antígeno  
CO<sub>2</sub>: Gás carbônico  
Con A: Concanavalina A  
COX: Ciclooxigenase  
CPM: Contagem por minuto  
DHA : Ácido Docosahexaenóico  
DNA: Ácido Desoxirribonucléico  
EDL: Músculo extensor longo do dedo  
EDTA: Ácido etilenodiaminotetraacético  
EPA: Ácido icosapentaenóico  
EROs: Espécies reativas de oxigênio  
GLUT-4: transportador-4 de glicose  
HDL: Lipoproteína de densidade alta  
HETEs: Ácidos hidroxiicosatetraenóico  
IFN $\gamma$ : Interferon  $\gamma$   
IL: Interleucina  
IL-1: Interleucina tipo 1  
IL-2: Interleucina tipo 2  
IL-6: Interleucina tipo 3  
IR: Receptor de insulina  
IRS: *Insulin receptor substrate*  
LDh: Lactato desidrogenase  
LDL: Lipoproteína de densidade baixa  
LH: Hormônio luteinizante  
LMF: Fator mobilizador de lipídeos  
LOX: Lipooxigenase  
LPL: Lipoproteína lipase  
LTs: Leucotrienos

NAD<sup>+</sup>: Nicotinamida adenina dinucleotídeo  
NADH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo forma reduzida  
NADPH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma reduzida, oxidase  
NK: *Natural killer*  
NF-κB: Fator nuclear-κB  
n: Ômega  
PBS: Tampão Salina Fosfatada  
PCI<sub>2</sub>: Prostaciclina da série 2  
PCI<sub>3</sub>: Prostaciclina da série 3  
PG: Prostaglandinas  
PGE<sub>2</sub>: Prostagladina E<sub>2</sub>  
PI3K: Fosfatidilinositol 3-quinase  
PIF: Fator indutor de proteólise  
PMA: Éster de forbol miristato acetato  
PUFAs: Ácidos Graxos Poliinsaturados  
rpm: Rotações por minuto  
TAGs: Triacilgliceróis  
TCA: Ácido tricloroacético  
TEA: Tampão trietanolamina  
TGF-β: Fator de crescimento transformante β  
TNFα: Fator de necrose tumoral-alfa  
TXs: Tromboxanas  
TXA<sub>2</sub>: Tromboxana da série 2  
TXA<sub>3</sub>: Tromboxana da série 3  
VLDL: Lipoproteína de densidade muito baixa

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### TABELAS

<b>TABELA 1</b> – Mecanismos biológicos que podem estar envolvidos na associação entre atividade física e câncer.....	23
<b>TABELA 2</b> – Peso dos indivíduos antes e 15 dias após a inoculação do tumor, peso dos tumores ao final de 15 dias e ganho de peso nesse período. ....	53
<b>TABELA 3</b> – Resumo dos dados: Glicemia, Lactato e TAGs. ....	56
<b>TABELA 4</b> – Resumo dos dados funcionais do peso do baço (em g) e do índice de proliferação de linfócitos T.....	618
<b>TABELA 5</b> – Resumo dos dados funcionais dos macrófagos peritoneais .....	61
<b>TABELA 6</b> – Resumo dos dados funcionais dos neutrófilos.....	63

### FIGURAS

<b>FIGURA 1</b> – Perfil do consumo de gordura e ácidos graxos da espécie humana ao longo dos anos. Adaptado de SIMOPOULOS (1999a).....	11
<b>FIGURA 2</b> – O ciclo de Cori. ....	16
<b>FIGURA 3</b> – Metabolismo protéico muscular no indivíduo caquético.....	18
<b>FIGURA 4</b> – Processo de conjugação da proteína-alvo à ubiquitina para degradação .....	19
<b>FIGURA 5</b> – Sistema proteosoma ubiquitina-ATP dependente.....	19
<b>FIGURA 6</b> – Regulação do sistema proteosoma ubiquitina-ATP dependente por citocinas e fatores de transcrição. ....	20
<b>FIGURA 7</b> – Via de sinalização intracelular pela insulina.....	22
<b>FIGURA 8</b> – Representação esquemática de todos os elementos celulares que constituem o sistema imunitário. ....	25
<b>FIGURA 9</b> – Estrutura e metabolismo dos PUFAs n-6 e n-3. ....	32
<b>FIGURA 10</b> – Metabolismo dos ácidos graxos poliinsaturados.....	34
<b>FIGURA 11</b> – Evolução do peso corpóreo dos indivíduos. ....	51
<b>FIGURA 12</b> – Peso do tumor (g) .....	52
<b>FIGURA 13</b> – Glicemia (mg/dL) .....	54
<b>FIGURA 14</b> – Concentração de lactato sérico (mmol/L) .....	55
<b>FIGURA 15</b> – Concentração de Triacilglicerol sérico (mg/dL).....	56
<b>FIGURA 16</b> – Peso do baço (g) .....	58
<b>FIGURA 17</b> – Índice de proliferação de linfócitos T .....	59
<b>FIGURA 18</b> – Capacidade Fagocítica dos macrófagos peritoneais .....	60
<b>FIGURA 19</b> – Produção de peróxido de hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) pelos macrófagos peritoneais.....	61
<b>FIGURA 20</b> – Capacidade fagocítica dos neutrófilos .....	63
<b>FIGURA 21</b> – Produção de peróxido de hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) pelos neutrófilos .....	64
<b>FIGURA 22</b> – Efeitos benéficos e prejudiciais de um imunonutriente sobre a imunidade inata e adaptativa, com ênfase nas propriedades relacionadas ao câncer.. ..	70
<b>FIGURA 23</b> – Esquema geral dos efeitos do exercício moderado e intenso sobre a função imune e suscetibilidade a infecção. ....	71
<b>FIGURA 24</b> – Curva em forma de J proveniente da relação entre o nível de atividade física e a resposta imunitária.....	71

## RESUMO

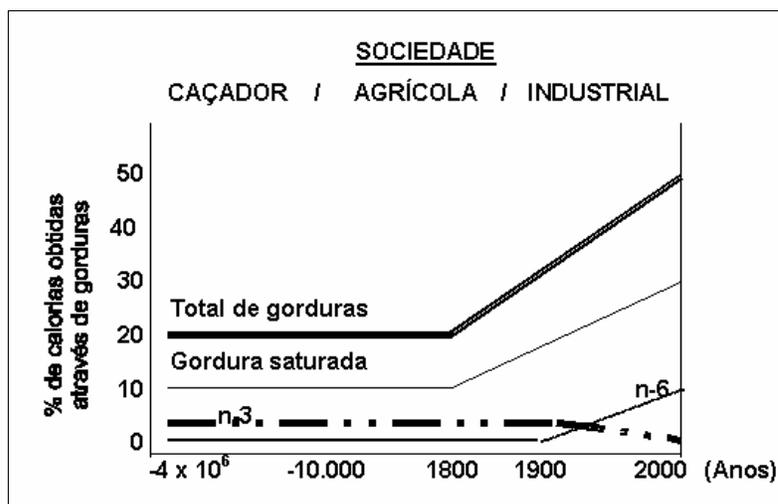
Anualmente, o câncer contribui para 7,1 milhões de mortes no mundo (12.6% do total global). Pacientes com câncer em estágio avançado, geralmente, tem anorexia, perda de peso tornando-se profundamente debilitados, encontrando dificuldades nas atividades mais básicas. Estas são manifestações da síndrome denominada caquexia. A caquexia é processo catabólico profundo caracterizado por mudanças intensas no metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídios. Vários estudos vêm demonstrando que a dieta com PUFAS n-3, usualmente na forma de óleo de peixe, é capaz de reduzir o crescimento tumoral em vários modelos animais e que a atividade física oferece proteção contra malignidades. A hipótese para esses efeitos é que seriam provocados por alterações no sistema imunitário. O estudo da associação de dieta e atividade física sobre o crescimento tumoral tem sido pouco explorado. O presente trabalho investigou o efeito da suplementação com óleo de peixe (rico em PUFAs n-3),  $1 \text{ g/kg de peso corporal}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$ , associado ao treinamento de saltos em ratos Wistar portadores do tumor de Walker 256. Setenta e dois animais foram randomicamente divididos em oito grupos: Sedentário sem suplementação (S), Sedentário com suplementação de óleo de peixe (SO), Sedentário portador de tumor (SW), Sedentário portador de tumor suplementado com óleo de peixe (SWO), Exercitado sem suplementação (EX), Exercitado com suplementação de óleo de peixe (EXO), Exercitado portador de tumor (EXW) e Exercitado portador de tumor suplementado com óleo de peixe (EXWO). Após seis semanas de treinamento de saltos, 1mL 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 do tumor, coincidindo com a oitava semana de treinamento, os animais foram ortotansasiados, em que sangue e tecidos foram coletados. Os dados foram submetidos à análise de variância de duas vias (two way ANOVA) com o pós-teste de Bonferroni, com nível de significância para  $P < 0,05$ . O grupo SW apresentou hipoglicemia ( $84,10 \pm 3,15 \text{ mg/dL}$ ), hiperlaticidemia ( $2,595 \pm 0,13 \text{ mmol/L}$ ) e hipertriacilglicerolemia ( $97,10 \pm 3,23 \text{ mg/dL}$ ), caracterizando estado caquético. Os grupos que realizaram o protocolo de treinamento ou que foram submetidos à suplementação com óleo de peixe tiveram todos esses parâmetros similares quando comparados aos do grupo controle (S). Em adição, foi observada redução significativa do crescimento tumoral nos grupos SWO, EXW e EXWO (peso médio do tumor = 11g) quando comparado ao do grupo SW ( $19,8 \pm 2,02\text{g}$ ). As capacidades fagocítica e citotóxica de macrófagos peritoneais e neutrófilos estavam aumentadas nos grupos com tumor assim como nos ratos dos grupos SO, EX e EXO, exceto para a produção de  $\text{H}_2\text{O}_2$  dos macrófagos peritoneais. Este efeito sobre o sistema imunitário poderia contribuir pela diminuição do crescimento tumoral nos grupos SWO, EXW e EXWO. A prática de exercício de força e a suplementação de óleo de peixe foram eficazes em induzir a redução da taxa de crescimento tumoral e o aparecimento dos sintomas da caquexia, quando realizados em associação ou de forma isolada. Nós aventamos a hipótese que a redução do crescimento tumoral pela administração de óleo de peixe e também pelo exercício físico devam compartilhar a mesma via, pois a associação de ambas estratégias não modificou este quadro. Ainda, o sistema imunitário desempenha papel coadjuvante neste cenário.

## ABSTRACT

Around 7.1 million people die every year world wide due to cancer. Most cancer patients (20-70%) die with cachexia as primary cause. Cachexia is a syndrome characterized by changes in the carbohydrate, fat and protein metabolism, leading to progressive body weight loss as a result of fat and lean body mass depletion. Progressive body weight loss is linked to poor prognosis. In experimental cancer models feeding high levels of fish oil-derived long-chain (n-3) fatty acids, eicosapentaenoic acid [20:5(n-3), EPA] and docosahexaenoic acid [22:6(n-3), DHA], inhibits tumor growth. Low to moderate intensity exercise increases host resistance to tumorigenesis. It has been suggested that these effects is caused by alterations in the host immune system. Studies involving dietary (n-3) fatty acids and exercise on immunocompetence have been poorly investigated. This study aimed to investigate the effects of resistance training and supplementation of fish oil (rich in polyunsaturated fatty acids n-3)( 1g/kg body weight/day) on tumor growth, cachexia and immunitary parameters in Walker 256 tumor-bearing rats. The animals were divided into 8 groups: sedentary (S), sedentary tumor-bearing (SW), sedentary supplemented (SO), sedentary tumor-bearing supplemented (SWO), exercised (EX), exercised tumor-bearing (EXW), exercised supplemented (EXO) and exercised tumor-bearing supplemented (EXWO). Training session consisted of 10 bouts, 30 seconds each with 50% body-weight load attached to the back followed by 1 minute of resting, 4 times a week during 8 weeks. A suspension of Walker 256 tumor cells ( $3 \times 10^7$  cells/ml) were inject in the rats (tumor-bearing) after 6 weeks of training. All individuals were killed 15 days post tumor inoculation and the blood, tissue and cells were harvested. The SW group showed hypoglicemia ( $84.10 \pm 3.15$  mg/dl), hyperlacticidemia ( $2.59 \pm 0.13$  mmol/l) and hypertriglycerolemia ( $97.10 \pm 3.23$  mg/dl) featuring a cachetic state. There were no modifications in these parameters for SWO, EXW and EXWO groups when compared to S group. Also, there was a expressive reduction of the tumor growth in the SWO, EXW and EXWO (mean tumor weight = 11g) vs.  $19.8 \pm 2.02$ g in SW group. Phagocytic and cytotoxic capacity of peritoneal macrophages and neutrophils was increased in the tumor-bearing groups as well as in the SO, EX and EXO, except for peroxide hydrogen production from macrophage. These effects upon immune system might contribute for tumor growth reduction observed in SWO, EXW and EXWO groups. We suggest that tumor growth reduction by fish oil administration and by physical exercise must share the same mechanisms because their association did not cause any further increase in the results obtained by them alone.

## 1 – INTRODUÇÃO

Através de técnicas de biologia molecular foi possível demonstrar que fatores genéticos são determinantes da suscetibilidade para o desenvolvimento ou não de doenças e que fatores ambientais determinam quais indivíduos geneticamente suscetíveis serão afetados. Estudos sobre a evolução da dieta humana mostram que esta sofreu alterações importantes, principalmente na quantidade de lipídeos consumidos, particularmente no tipo de ácidos graxos consumidos (SIMOPOULOS, 1999a). Nos últimos cento e cinquenta anos, a partir da revolução industrial, houve grande alteração na ingestão de gorduras (FIGURA 1), tanto na quantidade quanto nas proporções consumidas dos tipos de ácidos graxos. Essas alterações têm sido grandemente correlacionadas com o aumento da prevalência de doenças crônico-degenerativas tais como diabetes, hipertensão arterial, aterosclerose, obesidade e câncer (SIMOPOULOS, 1999b). Anualmente, o câncer contribui para 7,1 milhões de mortes no mundo (12.6% do total global). Aproximadamente 20 milhões de pessoas sofrem de câncer, com projeção de aumento para 30 milhões dentro dos próximos 20 anos (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2005). Os poluentes ambientais e as opções de estilo de vida, como tabagismo, contribuem significativamente para a ocorrência de câncer. Todavia, muitos tipos de câncer ocorrem sem a contribuição de qualquer determinante evidente. Em alguns desses casos, a predisposição genética na forma de uma mutação preexistente, pode facilitar a formação do câncer (PASTERNAK, 2002).



**FIGURA 1** – Perfil do consumo de gordura e ácidos graxos da espécie humana ao longo dos anos. Adaptado de SIMOPOULOS (1999a).

Pacientes com câncer em estágio avançado, geralmente, tem anorexia, perda de peso tornando-se profundamente debilitados, encontrando dificuldades nas atividades mais básicas. Estas são manifestações da síndrome denominada caquexia. A caquexia é processo catabólico profundo caracterizado por intenso quebra dos estoques de proteínas, carboidratos e lipídios (MACDONALD, 2003). Embora a síntese protéica e o consumo de aminoácidos estejam reduzidos contribuindo para a resposta catabólica no músculo esquelético, o aumento da proteólise das proteínas miofibrilares actina e miosina, é o mecanismo mais importante da caquexia muscular. Conseqüentemente, isso aumenta a perda e a fraqueza muscular, atrasando ou complicando a reabilitação dos pacientes, prejudicando as atividades da vida diária e conseqüentemente diminuindo a qualidade de vida (INUI, 2002; AL-MAJID & MCCARTHY, 2001b; HESPEL et al., 2001; HASSELGREN & FISCHER, 2001; BRUERA, 1997).

Os mecanismos específicos que compreendem a perda muscular induzida pelo câncer não são conhecidos. Na maioria dos pacientes, a caquexia é causada por anormalidades metabólicas devido à presença do tumor e pela liberação de produtos pelo tecido tumoral e citocinas pelo sistema imunitário (BRUERA, 1997). Estudos também sugerem que as várias vias proteolíticas ativadas levam a alterações no metabolismo protéico muscular, em que a degradação de proteína muscular excede a síntese protéica no músculo, resultando em balanço nitrogenado negativo e a perda muscular (TISDALE, 2003; TISDALE, 2000). Intervenções para preservar a massa muscular têm importantes implicações clínicas e valor funcional em termos de melhorar o prognóstico e a qualidade de vida dos pacientes com câncer (HESPEL et al., 2001; AL-MAJID & MCCARTHY, 2001b). Das várias possibilidades terapêuticas para se reverter essas complicações, a nutrição enteral e parenteral, inicialmente, foram as mais utilizadas. Entretanto, estas não foram demonstradas serem capazes de promover melhoria ou sobrevivência do paciente ou mesmo a redução do tumor (BRUERA, 1997). Outra possível intervenção aventada foi a de se atenuar à progressão da perda muscular durante o crescimento do tumor pelo treinamento de força (AL-MAJID & MCCARTHY, 2001b).

O treinamento de força tornou-se forma popular de exercício e é recomendado pela Organização Mundial de Saúde (2005) e pelo “American College of Sports Medicine” (1999) para a maioria das populações, incluindo adolescentes, adultos, idosos e indivíduos com doenças cardiovasculares e neuromusculares. O

treinamento de força é executado por aqueles que pretendem ganhar massa muscular, como os fisiculturistas. Atualmente, há demonstração de outros benefícios, relacionados à saúde pelo treinamento de força. Al-Majid & McCarthy (2001b) demonstraram que camundongos com câncer submetidos a oito sessões de treinamento de força, tiveram atenuação da perda muscular e da depleção protéica no músculo extensor longo do dedo (EDL). Esta atenuação foi paralela ao aumento no conteúdo de proteína muscular, sugerindo que o aumento no peso muscular foi devido ao aumento na massa muscular total e não devido a edema. Em outro estudo Tamaki et al (1992) demonstraram, em ratos, que 12 semanas de treinamento de força foi capaz de aumentar o número de fibras do músculo plantar em 14% quando comparado ao do grupo controle e ao do grupo de treinamento de *sprint*. Assim, o aumento da síntese protéica pode ser provocado por sinalização via hipertrofia, que estaria contra agindo a ação catabólica da presença do tumor.

## 1.1 Câncer

Câncer é o termo abrangente para designar crescimento celular descontrolado. Basicamente se desenvolve quando há falha nos processos que induzem a divisão celular, defeito no controle do ciclo de divisão celular e/ou desequilíbrio no controle da morte celular programada (apoptose). Célula cancerosa é uma célula somática com mutações acumuladas em diferentes genes ou grupos de genes, resultando em perda do controle de proliferação celular. Como consequência, forma-se massa celular denominada tumor, com capacidade ilimitada de crescimento (PASTERNAK, 2002). As mutações que produzem células cancerosas afetam duas grandes classes de genes: 1ª) genes de proliferação, conhecidos como proto-oncogenes, que codificam proteínas que normalmente auxiliam na divisão celular; 2ª) genes anti-proliferativos, conhecidos como genes supressores tumorais, que codificam proteínas que normalmente auxiliam na inibição da divisão celular. A mutação em um proto-oncogene, provoca a superexpressão ou hiper-atividade da proteína por ele codificada, resultando em multiplicação celular excessiva; o gene mutante é então classificado como oncogene. Proliferação celular excessiva também será o resultado de mutações que inativem um gene supressor tumoral, por liberar a célula de restrições normais da multiplicação celular. Na célula diplóide normal há duas cópias de cada gene supressor tumoral e ambas devem ser

inativadas para que haja perda do controle da proliferação, pois uma única cópia é geralmente suficiente para a regulação normal do ciclo celular. Ao contrário, apenas uma cópia de um proto-oncogene precisa ser mutada em um oncogene para que ocorra efeito semelhante (ALBERTS et al., 1999).

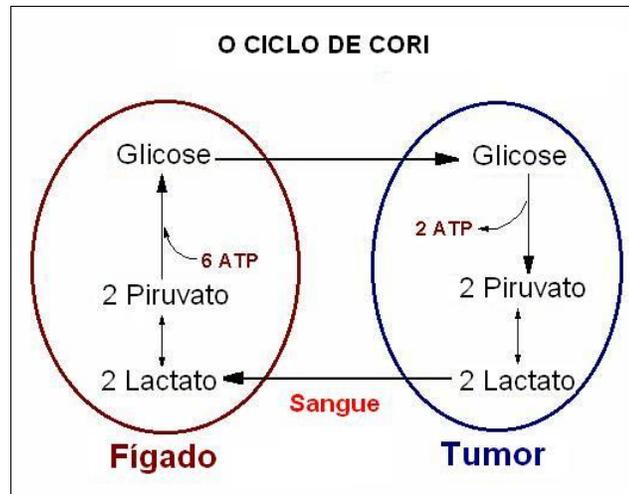
Todos os neoplasmas dependem de suporte estrutural, nutricional, vascular e em alguns casos, até humoral, que são supridos pelo próprio organismo, de modo a se comportarem como um parasita que depleta as reservas do hospedeiro (CURI, 2000). Geralmente, alguns tumores competem com o hospedeiro por nutrientes, provocando diferentes manifestações clínicas, onde as mais comuns são astenia, anorexia, perda de peso, saciedade prematura e anemia (TISDALE, 2004). Assim, o desenvolvimento tumoral pode induzir a debilidade do organismo hospedeiro, condição denominada de síndrome da caquexia (TISDALE, 2004).

Tumor de Walker 256 é um carcinossarcoma, identificado pela primeira vez em 1928 (BLACK et al, 1994), na mama de uma rata prenhe. George Walker constatou que o crescimento do tumor diminuiu durante o período de lactação, entretanto, voltou a crescer rapidamente, confirmando-se que o mesmo 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, sempre com o desenvolvimento de tumor sólido (CALDAROLA et al, 1968). 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 (EARLE, 1935). WK apresenta-se em dois subtipos: tipo A metastizante, que leva à morte do animal portador em aproximadamente 27 dias; e o tipo B que não forma metástase, mas que por sua vez, induz caquexia precoce do portador, levando-o à morte em 15 dias. Desde sua descoberta em 1928, esse linhagem tumoral tem sido amplamente utilizada em estudos antineoplásicos e de caquexia câncer-induzida, por ser espécie-específica para murinose facilmente transplantada (FERNANDES et al, 1995). Além disso, promove importantes mudanças metabólicas e iônicas no organismo portador (BOECKH-HAEBISCH, et al, 1998), hipoinsulinemia, elevação da concentração sérica de glucagon, cortisol, adrenalina, que contribuem para o estabelecimento da caquexia (FERNANDES, et al, 1990; 1997).

## 1.2 Caquexia

A caquexia é uma síndrome complexa cujo desenvolvimento tem enorme impacto negativo ao paciente com câncer (TISDALE, 2004), aumentando a taxa de morbidade e mortalidade dos pacientes com malignância avançada (ROSS & FEARON, 2002). Cerca de metade dos pacientes com câncer apresentam essa síndrome, caracterizada pela perda específica de tecido adiposo e massa muscular esquelética (TISDALE, 2004), fadiga, anorexia, saciedade precoce, sarcopenia, anemia e edema. Essas características são acompanhadas por mudanças no metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídios (ROSS & FEARON, 2002; TISDALE, 2001). A perda de massa muscular e gordura pode ter como causas diretas fatores liberados pelo tumor ou indiretamente, devido a respostas do hospedeiro à presença do tumor. Uma possível interação de produtos tumorais, mudanças neuroendócrinas e moléculas inflamatórias do hospedeiro provavelmente levam a debilidade dos pacientes (MACDONALD et al., 2003). Estas alterações nem sempre são explicadas pela anorexia acompanhante do quadro, que parece ser mais efeito do que causa da perda de peso no câncer (TISDALE, 2004), uma que suplementações nutricionais sozinhas não revertem o quadro (TISDALE, 1997).

Alterações no metabolismo de carboidratos incluem resistência periférica à insulina, que é também mediada pelas citocinas pró-inflamatórias, e relativa intolerância à glicose (TISDALE, 2000). A maioria dos tumores sólidos, que devido às alterações de isoenzimas ou pela sua pobre vascularização são naturalmente hipóxicos e dependem quase que exclusivamente do metabolismo anaeróbico da glicose como sua principal fonte energética, gerando lactato. Em condições catabólicas pode ocorrer a conversão de lactato em glicose pelo fígado por gliconeogênese, processo conhecido como ciclo de Cori (DUNLOP; CAMPBELL, 2000). O ciclo de Cori normalmente é responsável por 20% do *turnover* da glicose, mas em pacientes com câncer sua atividade está aumentada em até 50%, sendo responsável pela geração de 60% do lactato produzido (TISDALE, 2000). A conversão de glicose em lactato nas células tumorais produz duas moléculas de ATP, enquanto a conversão de lactato em glicose no fígado requer seis de ATP (FIGURA 2).



**FIGURA 2 – O ciclo de Cori.**

A glicólise é método ineficiente de produção de energia quando comparado com à fosforilação oxidativa. Glicose é consumida avidamente pelo tumor e a demanda de glicose pelas células tumorais é acompanhada por marcada diminuição na utilização de glicose pelos outros tecidos do hospedeiro, em particular o cérebro, situação similar à encontrada no jejum. Descartando sua perda de peso, pacientes com câncer apresentam aumento de 40% na produção hepática de glicose comparada com à de sujeitos normais (TISDALE, 1997).

Mudanças no metabolismo de gorduras na caquexia incluem lipogênese diminuída, hipertriacilglicerolemia, aumento da secreção hepática de VLDL, na síntese *de novo* de ácidos graxos e um ciclo fútil de ácidos graxos entre o fígado e o tecido adiposo, além do aumento da lipólise (TISDALE, 2004). Esse aumento da atividade lipolítica libera glicerol, substrato para a gliconeogênese hepática e, ácidos graxos livres para serem utilizados como substrato alternativo à glicose pelos tecidos periféricos (THOMPSON et al., 1981). A mobilização de ácidos graxos a partir do tecido adiposo do hospedeiro pode ser contribuinte importante para o crescimento do tumor. A hiperlipidemia encontrada tanto em humanos quanto em modelos animais experimentais portadores de tumor, está associada à produção de fatores catabólicos do próprio tumor (LMF - fator de mobilização lipídica) e pela redução da atividade da enzima LPL (lipoproteína lipase), responsável pelo armazenamento dos ácidos graxos no tecido adiposo (TISDALE, 1997). A LPL é uma enzima estimulada pela insulina. Fernandes et al. (1990) mostrou hipoinsulinemia em ratos portadores do tumor de Walker 256. O LMF parece agir diretamente nos adipócitos estimulando

a lipólise numa maneira dependente de AMPc por um mecanismo similar ao da lipase hormônio sensível. A atividade da LPL, por sua vez, está reduzida pela ação das citocinas produzidas pelos linfócitos e pelo próprio tumor, resultando em aumento no fluxo de lipídeos na circulação (TISDALE, 2001). Há relatos de diminuição da atividade de algumas enzimas chave da lipogênese, como a acetil-COA carboxilase e da ácido graxo sintase (TORTI et al., 1985), necessárias para a síntese *de novo* de ácidos graxos. A supressão dessas e de outras enzimas anabólicas pode constituir a base bioquímica que habilita o TNF a depletar os estoques de lipídeos.

Fatores derivados de tumores também estariam envolvidos no processo de patogênese da caquexia. Esses derivados foram isolados e denominados fator indutor de proteólise (PIF) e já comentado LMF. Estes fatores induzem diretamente a proteólise e a lipólise, respectivamente, não somente *in vivo*, mas também em preparações isoladas de músculo. O PIF parece ter efeito direto na inibição da captação de glicose pelo músculo esquelético, levando à resistência à insulina (ARGILÉS et al., 2003).

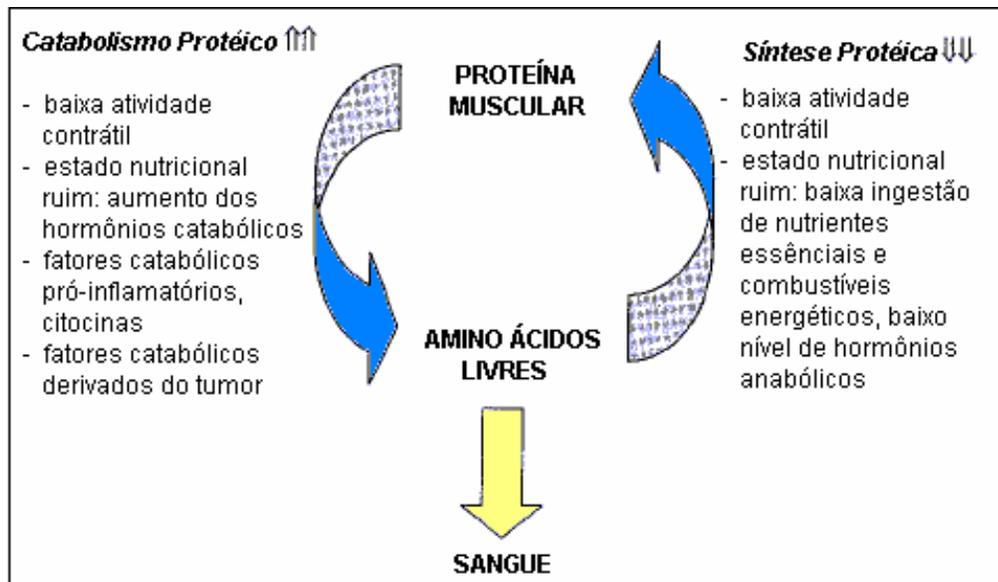
Algumas teorias sugerem competição entre o tumor e o hospedeiro por nutrientes, em que o tumor progride às custas do hospedeiro. Tisdale (2000) mostrou que ao transplantar adenocarcinoma de cólon MAC16 de rato, em camundongos, a perda de peso foi proporcional ao tamanho do tumor e ocorreu sem redução da ingestão calórica. Entretanto, em outro trabalho, o mesmo autor demonstrou que alguns pacientes com grandes tumores, não apresentaram sinais de caquexia, enquanto em outros a caquexia estava presente mesmo com o tumor representando apenas 0,01% do peso corporal (TISDALE, 2001). Isto sugere que as alterações metabólicas induzidas pela caquexia dependem mais do tipo do que do tamanho do câncer dos pacientes.

### **1.2.1 Alterações no Metabolismo Protéico e Perda de Peso**

#### **1.2.1.1 Aumento do catabolismo protéico muscular**

Tanto a depressão na síntese de proteínas quanto o aumento na degradação protéica contribuem para a atrofia muscular (TISDALE, 2004). O balanço nitrogenado negativo na caquexia resulta de anabolismo diminuído e catabolismo

aumentado (BARACOS, 2000). O hipo-anabolismo implica em déficit no suprimento de aminoácidos, energia ou ainda de falha no estímulo anabólico normal requerido para a síntese protéica muscular acontecer. O hiper-catabolismo envolve a participação de mediadores catabólicos e ativação de proteases intracelulares. A presença simultânea de ambos cenários (FIGURA 3) resulta em atrofia muscular acelerada (MACDONALD, 2003).



**FIGURA 3** – Metabolismo protéico muscular no indivíduo caquético.

Há três vias proteolíticas principais responsáveis pelo catabolismo de proteínas no músculo esquelético (HASSELGREN, FISCHER; 2000):

1) Sistema lisossomal: envolvido com a proteólise de proteínas extracelulares e receptores celulares de superfície.

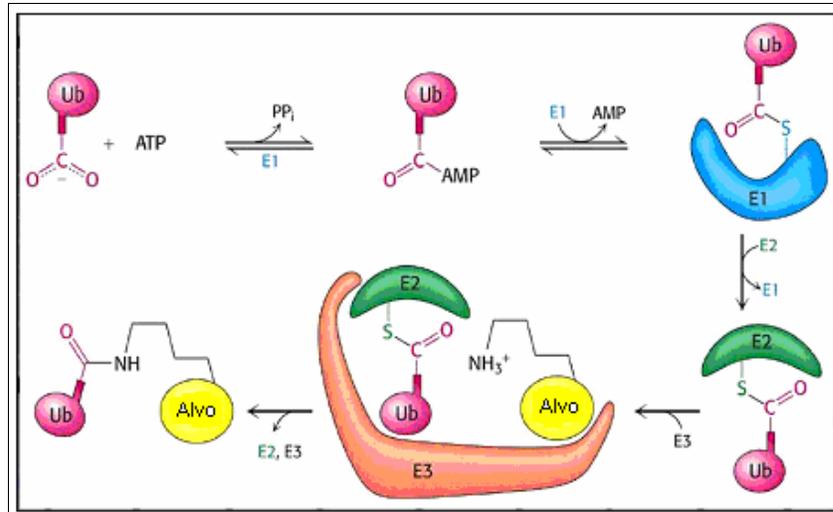
2) Sistema citossólico ativado pelo cálcio independente de ATP: envolvido na lesão tecidual, necrose e autólise;

3) Sistema ubiquitina - proteosoma dependente de ATP: responsável pela quebra do conjunto de proteínas intracelulares no músculo esquelético numa variedade de patologias como sepsis, acidose metabólica e a caquexia.

Tisdale (2004) sugere que o sistema lisossomal pode ser importante na degradação protéica nos estágios iniciais da atrofia muscular, enquanto o sistema ubiquitina-proteosoma teria papel mais importante na caquexia estabelecida.

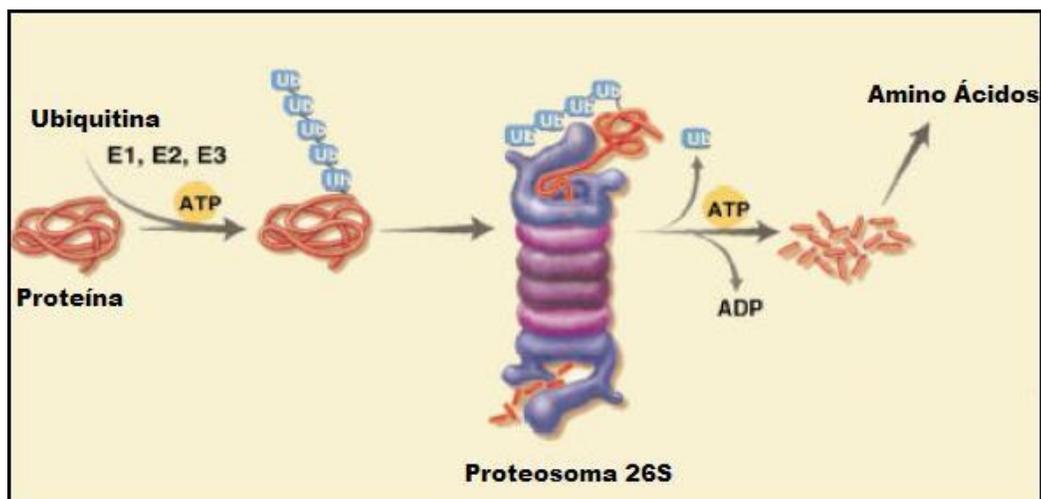
O sistema ubiquitina - proteosoma dependente de ATP envolve a ubiquitina, proteína monomérica de 76 aminoácidos. As proteínas são marcadas para

degradação pela sua ligação covalente a ubiquitina, num processo envolvendo 3 enzimas (FIGURA 4): enzima de ativação (E1), enzimas de conjugação/carreadoras (E2) e enzimas de conjugação (E3).



**FIGURA 4** – Processo de conjugação da proteína-alvo à ubiquitina para degradação

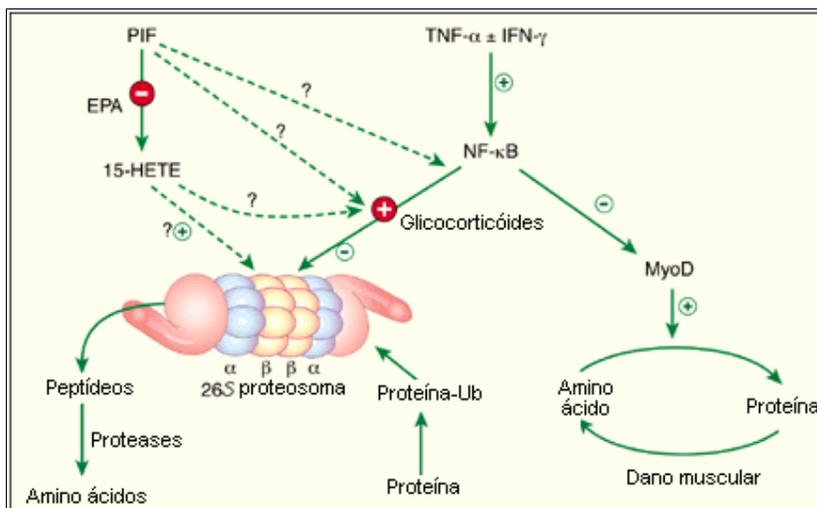
A proteína poli-ubiquitinada é então degradada em um complexo formado por multi-subunidades, o proteosoma 26S, estrutura em forma de tubo constituído por quatro anéis, duas  $\alpha$  nas extremidades e duas  $\beta$  na região central (FIGURA 5). O proteosoma libera pequenos oligo-peptídeos contendo de seis a nove resíduos de aminoácidos que são rapidamente degradados a aminoácidos pelas peptidases citosólicas (TISDALE, 2000).



**FIGURA 5** – Sistema proteosoma ubiquitina-ATP dependente.

A regulação do sistema ubiquitina-proteosoma no músculo esquelético durante a caquexia parece ser induzida por fatores tumorais ou do hospedeiro, responsáveis pela manutenção da caquexia. Concentrações celulares da proteína miofibrilar miosina, diminuem em concentrações por ação do PIF, que induz aumento na expressão do proteosoma (TISDALE, 2004). Estudos *in vitro* com  $TNF\alpha$  mostraram que ele estimula a conjugação das proteínas musculares à ubiquitina (LI, et al., 1998); induz diretamente à degradação protéica quando determinada pela liberação de tirosina ou 3-metilhistidina (LLOVERA et al., 1997); e provoca diminuição na miosina (LI, et al., 1998), mas não foi observada nenhuma mudança nas subunidades do proteosoma (LLOVERA et al., 1997).

Citocinas como  $TNF\alpha$  junto com  $IFN\gamma$  ativam a transcrição do fator nuclear- $\kappa B$  (NF- $\kappa B$ ). O NF- $\kappa B$  ativado atua como repressor da expressão de subunidade do proteosoma (FIGURA 6). Inibindo a expressão de uma única subunidade do proteosoma, o número de proteosomas fica diminuído, bem como a atividade proteolítica e a degradação protéica (GRUNE et al. 1998), atividade esta que é antagonizada pelos glicocorticóides. Fatores tumorais (ex: PIF) aumentam a produção de subunidades do proteosoma através do intermediário 15-HETE. Não é sabido se este é efeito direto ou indireto (CALVANI; BENATTI, 2003).



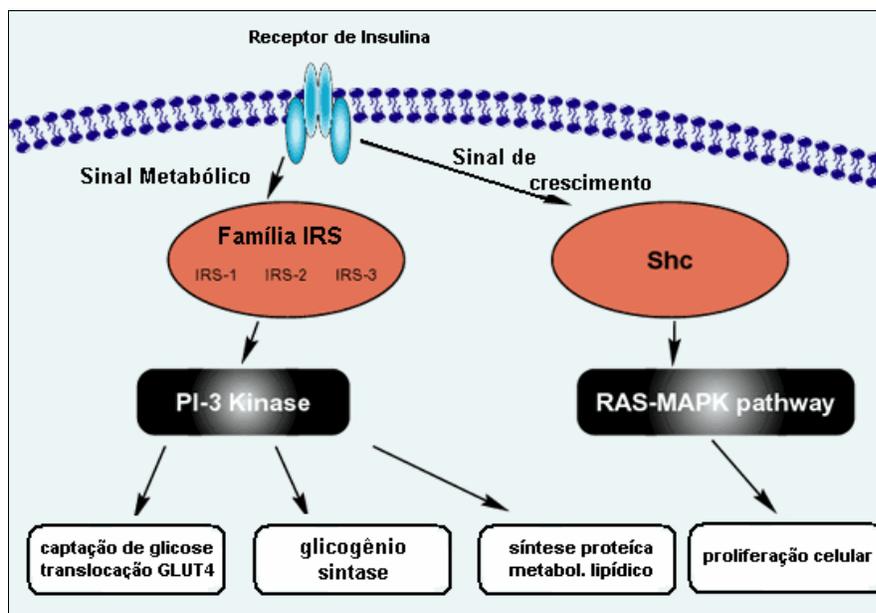
**FIGURA 6** – Regulação do sistema proteosoma ubiquitina-ATP dependente por citocinas e fatores de transcrição. Adaptado de Calvani; Benatti (2003).

### 1.2.1.2 Síntese protéica diminuída

A perda de tecido muscular em indivíduos caquéticos não está associada apenas ao elevado índice de catabolismo protéico TISDALE (2001). Em 2000, esse mesmo autor mostrou que a síntese de proteínas em indivíduos saudáveis está em torno de 53%, enquanto que em indivíduos caquéticos é de 8%. Conforme dito anteriormente citocinas, como o TNF- $\alpha$  juntamente com o IFN- $\gamma$ , ativam a transcrição do fator NF- $\kappa$ B. A transcrição do fator NF- $\kappa$ B tem sido identificada como inibidor da diferenciação celular do músculo esquelético e mediador da perda muscular induzida por citocinas em camundongos. Isto leva a diminuída expressão da MyoD (FIGURA 4), um fator de transcrição que é essencial para a diferenciação do músculo esquelético e para reparo do tecido danificado, e pode ser particularmente importante para a recuperação da musculatura debilitada (CALVANI; BENATTI, 2003). Indivíduos com câncer apresentam concentrações séricas elevadas de IL-1, a qual bloqueia a liberação de LH (hormônio luteinizante). Isto causa a diminuição das concentrações séricas de testosterona, o que também diminui o anabolismo protéico muscular (MORLEY, 2001). ARGILÉS et al. (1997) relataram que o transporte de aminoácidos para dentro do músculo esquelético também está prejudicado durante o crescimento tumoral, pois está relacionado com a sensibilidade à insulina. Há necessidade de insulina e aminoácidos para que seja estimulada o início da tradução, passo determinante da síntese protéica no músculo esquelético (KIMBALL; FARREL; JEFFERSON 2002).

Alguns indivíduos portadores de tumor podem apresentar resistência periférica à insulina (TAYEK, 1992) ou ainda diminuição da produção de insulina. A insulina é responsável por uma variedade de atividades biológicas que podem ser globalmente categorizadas dentro de ações metabólicas e mitogênicas. A ligação da insulina ao seu receptor (IR) ativa a atividade da tirosina kinase do receptor. A tirosina ativada e o IR fosforilado induzem o recrutamento e a fosforilação das proteínas adaptadoras como a IRS (*insulin receptor substrate*). A IRS fosforilada ativa PI3-kinase, resultando na translocação do transportador-4 de glicose (GLUT-4) para a membrana plasmática facilitando a captação de glicose. Esta cascata de sinalização IR-IRS-PI3-kinase ativa a via metabólica da insulina. A via mitogênica é também acionada pela ligação da insulina ao seu receptor (IR) e subsequente

fosforilação da Shc (Src homologous and collagen protein) e ativação da via Ras-MAPK (FIGURA 7).



**FIGURA 7** – Via de sinalização intracelular pela insulina.

### 1.3 Câncer e Atividade Física

Modificação dietética e atividade física regular são elementos significativos na prevenção e controle do câncer. Em contraposição, sobrepeso e obesidade são fatores de risco para o desenvolvimento de câncer (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2005). Evidências do efeito benéfico da atividade física sobre a incidência de câncer estão acumulando-se rapidamente e podem ser classificadas como convincentes para o câncer de mama e de cólon; provável para o câncer de próstata; possível para os cânceres de pulmão e do endométrio e; insuficiente para os cânceres de rins, pâncreas, melanoma, entre outros (FRIEDENREICH; ORENSTEIN, 2002). Estes autores conduziram em 2002, uma revisão na literatura sobre atividade física e câncer, onde quase 170 estudos epidemiológicos observacionais de atividade física e câncer foram citados. Um resumo dos principais achados desta revisão sobre os mecanismos biológicos que podem estar envolvidos na associação entre atividade física e câncer é mostrado na TABELA 1.

Mecanismos potenciais influenciados pelo exercício incluem alterações nos hormônios esteróides ou insulina e fatores de crescimento *insulin-like*, modulação

imunitária, alteração na geração de radicais livres, mudanças na composição corporal ou massa corpórea, e efeitos diretos sobre o tumor (WESTERLIND, 2003).

**TABELA 1 – Mecanismos biológicos que podem estar envolvidos na associação entre atividade física e câncer. (Adaptado de FRIEDENREICH; ORENSTEIN, 2002).**

Local do câncer	Possíveis mecanismos envolvidos	Análise
Cólon	Diminuído tempo de transito gastrointestinal	A atividade física aumenta a mobilidade intestinal e reduz o tempo de exposição da mucosa a carcinógenos
	Diminuída proporção de prostaglandinas	O exercício vigoroso pode aumentar a PGF, que reduz a proliferação celular relativa ao cólon, enquanto não aumenta a prostagladina E <sub>2</sub> (PGE <sub>2</sub> ), que apresenta efeito oposto.
	Secreção do ácido biliar diminuída ou metabolismo do ácido aumentado	As concentrações do ácido biliar podem ser diminuídas em pessoas ativas fisicamente.
Mama	Diminuição à exposição ao estrogênio	A atividade física atrasa a menarca, reduz o número de ciclos ovarianos e reduz a produção de estrogênio ovariano. Também reduz a gordura corporal e pode reduzir os estrógenos produzidos por ela. Aumenta a produção de globulina ligada ao hormônio sexual, resultando em menos estrogênio disponível biologicamente.
Próstata	Reduzida exposição a testosterona	A atividade física aumenta a produção de globulina ligada ao hormônio sexual, resultando em baixos níveis de testosterona livre.
Todos os cânceres	Predisposição genética das pessoas habitualmente	Fatores constitucionais influenciam a seleção atlética ou interesse na atividade física e suscetibilidade ao câncer.
	Aumento induzido pelo tumor nas defesas imunes antitumor	O exercício pode aumentar o número e atividade de macrófagos, células NK ativadas por linfocinas e sua regulação de citocinas; podem aumentar a proliferação linfocitária induzida por mitógeno.
	Melhores sistemas de defesa antioxidantes	O exercício vigoroso aumenta a produção de radicais livres, enquanto o exercício crônico melhora as defesas contra radicais livres e níveis antioxidantes.
	Diminuição nos níveis circulantes de insulina e glicose	A extensão das mudanças induzidas pelo exercício na defesa oxidante é desconhecida.
	Diminuição da insulina e fatores de crescimento insulin-like (IGFs)	O exercício pode aumentar os níveis de insulina e IGF-I biodisponíveis, os quais aumentam a divisão das células normais e inibem a morte celular.

Foi demonstrado que o exercício é capaz de atenuar a perda muscular induzida pelo câncer e aumentar a sobrevivência de roedores inoculados com tumor (AL-MAJID & MCCARTHY, 2001b; BACURAU et al., 2000). A atividade física espontânea promove efeitos benéficos para a síntese protéica, reverte a diminuição na concentração plasmática de hormônios anabólicos (insulina) e promove a redução da concentração de cortisol (importante indutor da proteólise). Assim, torna-se capaz de conservar a massa muscular, apesar da presença do tumor em

constante competição com o organismo por nutrientes (DANERYD et al., 1995). Ainda, em humanos portadores de tumor, a prática de exercício demonstrou ser capaz de aumentar o consumo máximo de oxigênio (McVICAR et al., 1989), reduzir a sensação de náusea (WINNINGHAM; McVICAR et al., 1988), diminuir a gordura corporal e aumentar a qualidade de vida (BURNHAM; WILCOX, 2002), aumentar a força dos membros inferiores em mulheres (NIEMAN et al., 1995). Em modelos animais, os efeitos observados incluem: inibição da tumorigênese (BARACOS, 1989), resistência à implantação do tumor, diminuição da taxa de crescimento tumoral e do aparecimento de metástases (LEE, 1995), além do aumento da síntese protéica muscular (AL-MAJID; McCARTHY, 2001b).

A maioria dos trabalhos envolvendo atividade física e câncer utiliza protocolos de exercício aeróbico, caracterizado por intensidade baixa à moderada e de longa duração. O treinamento de força, por sua vez, eleva as taxas de síntese protéica no tecido muscular esquelético (FARRELL et. al., 1999) e pode induzir a ganhos significativos de força e massa magra nos indivíduos que o praticam (BARACOS, 2001). Dessa forma, esse tipo de atividade pode ter efeito positivo na manutenção da massa muscular em indivíduos apresentando alto índice de perda de tecido muscular, como portadores de câncer.

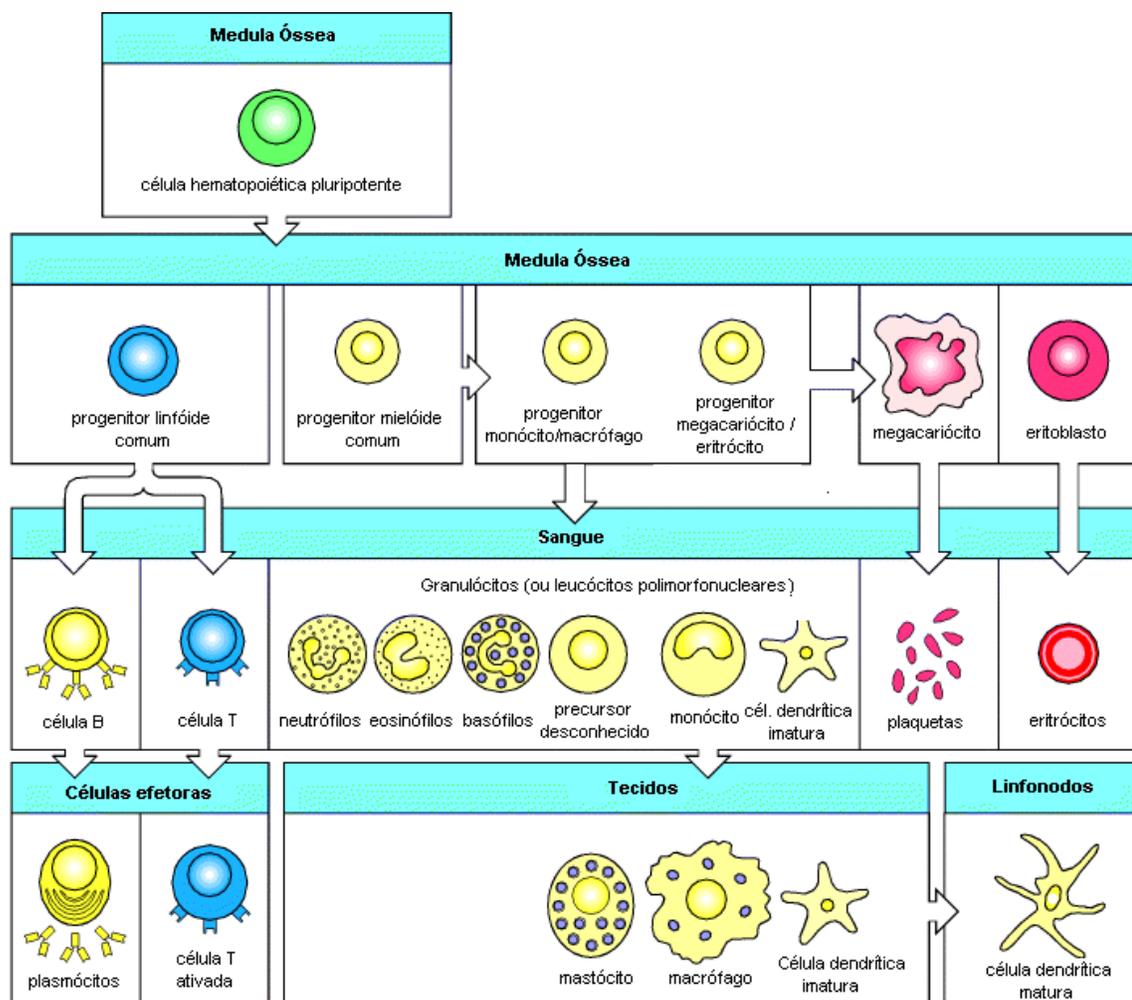
Zielinski e colaboradores (2004) mostraram que o exercício intenso, prolongado e diário causou atraso no crescimento tumoral, diminuição no número de células inflamatórias (macrófagos e neutrófilos) e diminuição dos vasos sanguíneos dentro dos tumores. Eles encontraram diminuição da angiogênese nos grupos que praticavam exercício, o que provavelmente colaborou para o menor crescimento do tumor e sua rápida regressão comparada ao grupo controle – sem exercício.

Nunes (2005), demonstrou que ratos submetidos a protocolo de exercício de saltos durante oito semanas tiveram diminuição da taxa de crescimento tumoral, preservação da massa corporal e atenuação de algumas mudanças no quadro metabólico causado pela síndrome da caquexia.

#### **1.4 Sistema Imunitário**

Imunidade é um estado de resistência ou proteção contra microorganismos patogênicos. Há dois tipos de imunidade, a inata e a adaptativa. A resposta imune inata fornece a primeira linha de defesa e não requer exposição prévia ao patógeno,

enquanto a resposta imune adaptativa requer exposição prévia. Tanto a imunidade inata quanto a adaptativa, são mediadas pelos leucócitos, células que se originam na medula óssea à partir de células tronco hematopoiéticas, que diferenciam-se numa variedade de células imunitárias especializadas (FIGURA 8). Os leucócitos podem ser divididos em duas categorias: os fagócitos (granulócitos – neutrófilos, basófilos, eosinófilos – monócitos e macrófagos) e os linfócitos. A comunicação entre o sistema inato e o adaptativo pode ocorrer pelo contato direto célula-célula e/ou pela liberação de mensageiros químicos (PHILPOTT, FERGUSON, 2004; JANEWAY et al., 2001; CALDER, 2001).



**FIGURA 8** – Representação esquemática de todos os elementos celulares que constituem o sistema imunitário. Adaptado de JANEWAY et al. (2001).

#### 1.4.1 - Características gerais dos fagócitos (macrófagos e neutrófilos)

### 1.4.1.1 - Macrófagos

Os macrófagos são extensamente distribuídos pelo corpo, tendo função crítica para a imunidade inata (JANEWAY, et al., 2001). Eles são a forma madura dos monócitos que circulam no sangue e diferenciam-se continuamente em macrófagos que migram para os tecidos (FIGURA 8). Os macrófagos caracterizam-se por serem células grandes, com forma irregular, medindo entre 10–80  $\mu\text{m}$  de diâmetro, núcleo irregular e excentricamente posicionado, com 1 ou 2 nucléolos e cromatina dispersa. Apresentam complexo de Golgi bem desenvolvido, em posição justanuclear, número variável de vesículas de endocitose e grande número de mitocôndrias. A superfície apresenta-se irregular, com microvilos e o citoesqueleto bem desenvolvido, rodeando o núcleo e estendendo-se até a periferia da célula (JANEWAY *et al.*, 2001, CALDER, 1998). Os macrófagos expressam grande quantidade de receptores de superfície, envolvidos nas interações desta célula com o ambiente e com o controle da sua atividade (crescimento, diferenciação, ativação, reconhecimento, endocitose e secreção). O pró-monócito ao dividir-se dá origem aos monócitos, que permanecem na medula óssea por aproximadamente 24 h, migrando posteriormente para a corrente sangüínea, na forma de monócitos circulantes, os quais permanecem na circulação por cerca de 70 h no homem. Uma vez na circulação, o monócito migra para diferentes órgãos e cavidades do organismo (passando a denominar-se macrófago), tais como: fígado (células de Kúpffer), pulmão (macrófago alveolar), tecido conectivo (histiócitos), baço (macrófagos da polpa vermelha), linfonodos, timo, osso (osteoclasto), trato gastrintestinal, sistema nervoso central (micróglia), cavidade pleural, cavidade peritoneal e medula óssea, (CALDER, 1998).

O macrófago desempenha papel importante no controle do desenvolvimento tumoral e passou a ser estudado a partir de observações de células infiltrantes em massas sólidas. Na vigência de tumores, o macrófago pode exercer seu papel tumoricida de três maneiras:

- a) Pela inibição da divisão celular, através da liberação de diferentes mediadores (mecanismo independente de contato celular);

- b) De maneira mediada, dependente de contato, envolvendo a produção de TNF e espécies reativas do oxigênio (EROs), como radical superóxido e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (KLIMP *et al.*, 2002);
- c) Através de mecanismos de citotoxicidade celular dependente de anticorpos (TASHIRO, 1998).

A atividade do macrófago infiltrado na massa tumoral pode ser regulada por substâncias liberadas pelo tumor, capazes de reprimir a resposta desta célula. Outros estudos demonstram efeito facilitador do macrófago no desenvolvimento de certos tumores sólidos, através da liberação de fatores que favorecem a angiogênese, permitindo melhor aporte de nutrientes e oxigênio para o tecido tumoral (KLIMP *et al.*, 2002). Os macrófagos são capazes de promover a angiogênese pela: a) secreção de enzimas proteolíticas que degradam a matriz extracelular, principalmente metaloproteases de matriz tipo 2 e 9 (MMP-2 e MMP-9) (HILDEBRAND *et al.*, 1998); b) pela secreção de fatores de crescimento tais como: fator de crescimento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$  *Transforming growth factor*), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF – *Platelet-derived growth factor*), fator de crescimento endotelial de vasos (VEGF – *Vascular endothelial growth factor*) e TNF- $\alpha$  (LEEK *et al.*, 1996). Contudo, os macrófagos associados aos tumores também liberam substâncias como: interferons, angiostatina, fator plaquetário 4 e trombospondina, que inibem a angiogênese por inibir a proliferação de células endoteliais (SUNDERKOTTER, 1994).

#### 1.4.1.2 – Neutrófilos

Os neutrófilos constituem 60% dos leucócitos circulantes. São os elementos mais numerosos e importantes da resposta inata, abundantes no sangue, mas ausente nos tecidos normais; são células de vida curta, sobrevivendo durante poucas horas após deixarem à medula óssea. Essas células são de 9 a 12  $\mu\text{m}$  de diâmetro possuem o núcleo lobulado, cromatina densa, sendo por isso também chamadas de leucócitos polimorfonucleares (CURI *et al.*, 1998). Os neutrófilos são considerados componentes essenciais da resposta inflamatória, desencadeando mecanismos de defesa contra agentes infecciosos. Uma vez ativados, os neutrófilos são atraídos ao local da inflamação por fatores quimiotáticos. Constituem as células

fagocíticas mais precocemente recrutadas para esse processo. Uma vez no local inflamado são capazes de eliminar muitos patógenos, restos de tecidos, por meio da fagocitose, liberação de espécies reativas do oxigênio e do nitrogênio (FAURSCHOU; BORREGAARD, 2003). Este fenômeno está associado com o aumento, transitório, do consumo de oxigênio pelos neutrófilos, denominado “burst” respiratório. Uma das principais enzimas envolvidas neste processo é a NADPH oxidase, a qual pode ser ativada pelo ácido araquidônico (AA). Em casos de infecção, a resposta inflamatória também envolve linfócitos, que efetuam resposta imunitária adaptativa, a qual é ativada via vasos linfáticos. A ativação dos linfócitos depende de forma crucial das interações com as células fagocíticas (JANEWAY et al., 2001).

#### **1.4.1.3 - Características gerais dos linfócitos**

A maior parte dos linfócitos são células sem traços característicos, pequenas, com poucas organelas citoplasmáticas e grande quantidade da cromatina nuclear inativa. Há duas classes principais de linfócitos: linfócitos B ou células B e os linfócitos T ou células T. Os linfócitos B reconhecem antígenos específicos circulantes, provocando sua expansão clonal e maturação em células secretoras de anticorpos (plasmócitos). Estes anticorpos ligam-se aos patógenos e os marcam para fagocitose pelas células do sistema imunitário inato. Os linfócitos T podem ser categorizados em células T citotóxicas ( $T_c$ ), células T-helper (T-auxiliares) e células T supressoras. As células  $T_c$  reconhecem antígenos específicos na superfície de células infectadas e as destroem pela secreção de fatores citotóxicos. As células T-helper reconhecem antígenos específicos expostos na superfície das células fagocíticas que haviam encontrado um patógeno (células apresentadoras de antígenos – CAP), e em resposta secretam fatores que atraem outras células do sistema imunitário para o local da infecção (células T-helper 1 –  $t_{H1}$ ), ou interagem com células B específicas para assistir sua transformação a plasmócitos (células T-helper 2 –  $t_{H2}$ ). As células T supressoras (células  $T_s$ ) não são tão bem conhecidas, mas parecem suprimir a ativação inapropriada do sistema imunitário adaptativo (PHILPOTT, FERGUSON, 2004). Uma terceira linhagem de linfócitos, chamada célula natural *Killer* (NK), caracterizam-se por não apresentarem receptores específicos para antígenos e fazem parte do sistema imunitário inato. Elas são

capazes de reconhecer e destruir algumas células anormais, por exemplo, alguns tumores e células infectadas por vírus. As células NK são importantes na imunidade inata na defesa contra patógenos intracelulares (JANEWAY et al., 2001).

Os linfócitos B e T originam-se na medula óssea, mas só os linfócitos B maturam-se nela. Os linfócitos T migram para o timo para sofrer sua maturação. Os linfócitos maduros circulam entre o sistema sanguíneo e o linfático, passando pelos órgãos linfóides secundários, que incluem as tonsilas, apêndice, linfonodos, e tecidos linfóides associados ao intestino (GALT – gut associated lymphoid tissue). Os tecidos linfóides secundários são agregações estruturadas de linfócitos que atuam como uma armadilha para as CAPs que migraram do local de infecção (PHILPOTT, FERGUSON, 2004). As respostas imunitárias adaptativas são iniciadas nestes tecidos linfóides secundários: células T que encontram o antígeno proliferam-se e diferenciam-se em células efetoras específicas para o antígeno, enquanto as células B proliferam-se e diferenciam-se em células secretoras de anticorpos (JANEWAY et al., 2001).

## 1.5 Citocinas

As citocinas são um grande grupo de glicoproteínas solúveis e peptídeos de baixo peso molecular. Elas diretamente medeiam interações entre células e regulam funções celulares e teciduais. As citocinas têm grande participação em coordenar o desenvolvimento embrionário, o crescimento e maturação celular, processos de cura e reparo e na modulação da resposta imunitária de fase aguda bem como na formação de novos vasos sanguíneos. As citocinas podem ser secretadas, provavelmente, por todas as células humanas, sendo que muitas citocinas são liberadas tanto na forma ativa como na forma de precursores inativos que requerem ativação; algumas se ligam a matriz extracelular (DUNLOP; CAMPBELL, 2000).

A expressão descontrolada de citocinas pode ocorrer em células que passaram por processos de transformação tornando-se malignas (DUNLOP; CAMPBELL, 2000). As citocinas interagem com as células via receptores de alta afinidade geralmente glicoproteínas, que estão localizadas na membrana celular ligadas a segundos mensageiros que podem acionar várias vias. As interações das citocinas podem ser: (1) intrácrina – a citocina e o receptor permanecem no interior da célula (raro); (2) autócrina – uma citocina produzida por uma célula atua sobre o

receptor de membrana na própria célula que a produziu; (3) parácrina – a citocina de um tipo celular é liberada localmente no espaço extracelular e interage com receptores de outros tipos celulares vizinhos. Isto pode envolver contato célula-célula, por citocinas ligadas a membrana. Se quantidades suficientes de citocinas são produzidas, elas podem ter efeito sistêmico. Os efeitos de qualquer citocina, geralmente, podem variar de acordo com sua concentração, com a presença de outras citocinas, com o estado de desenvolvimento das células ou tecido alvo e do ambiente extracelular. Esta complexidade implica em análise cautelosa de estudos *in vitro* e *in vivo* (DUNLOP; CAMPBELL, 2000).

Quando secretadas por células cancerígenas, as citocinas são capazes de induzir o suporte tecidual (fibroblastos e vasos sanguíneos) para o crescimento tumoral, assim como permitir metástase. Ao desenvolvimento da caquexia tem sido, envolvido a participação de certas citocinas, como o  $TNF\alpha$ , interleucinas (IL) IL-1, IL-2 e IL-6 e  $IFN\gamma$ , que são produzidas pelos tecidos do hospedeiro ou por certas células tumorais (TISDALE, 2004). A presença dessas citocinas leva à anorexia, perda de peso, alterações no metabolismo de lipídeos, aumento do *turnover* protéico, das concentrações de cortisol, de glucagon e de adrenalina (hormônios catabólicos), redução das concentrações de insulina (hormônio anabólico) e as mesmas favorecem o quadro de resistência periférica à insulina, aumentam a respostas das proteínas de fase aguda (proteína C reativa), tanto em modelos animais quanto em estudos em humanos (DUNLOP; CAMPBELL, 2000; BARBER, 2001).

### **1.6 Metabolismo dos ácidos graxos poliinsaturados e sua relação com os processos neoplásicos**

Ácidos Graxos (AGs) provém da alimentação na forma de triacilgliceróis (TAGs) e são armazenados para reserva energética e metabólica (FAGUNDES, 2002). Funcionam como co-fatores enzimáticos, detergentes, transportadores, hormônios e mensageiros celulares (CURI et al., 2002). A estrutura geral dos AGs é uma cadeia de hidrocarbonetos com um grupo carboxila (COOH) numa extremidade e um metila ( $H_3C$ ) na outra. Contém sempre número par de carbonos e podem ser classificados como AG de cadeia curta (4 a 6 carbonos), média (6 a 10 carbonos) e longa (acima de doze carbonos) (CALDER, 2005).

Os AGs contendo duplas ligações na cadeia de hidrocarbonetos são denominados ácidos graxos insaturados; se possuir duas ou mais ligações duplas é chamado de ácido graxo poliinsaturado (PUFAs). As duplas ligações têm grande importância, pois aumenta a flexibilidade da cadeia e conseqüentemente a fluidez das membranas biológicas. PUFAs tem efeitos sobre diversos processos biológicos tendo impacto sobre a saúde e doenças crônicas, bem como na regulação da: concentração de lipídeos plasmáticos; função cardiovascular e imunitária; ação da insulina; desenvolvimento neuronal e função visual. Em adição, a ingestão de PUFAs tem efeito sobre a composição e função de membranas, síntese de eicosanóides, sinalização intracelular e celular, bem como na regulação da expressão gênica (CALVANI; BENATTI, 2003).

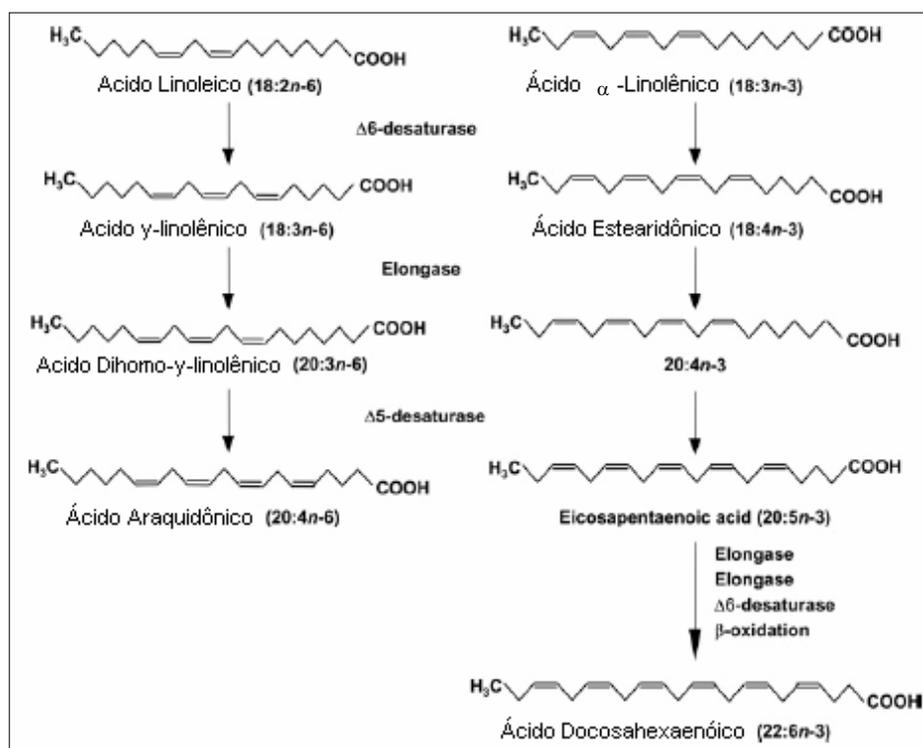
Os AGs têm famílias distintas as quais podem ser diferenciadas pela localização da dupla ligação a partir de sua extremidade metila. Conseqüentemente, um ácido graxo de 18 carbonos com duas duplas ligações na cadeia e com a primeira dupla ligação no carbono 6 a partir do terminal metila, é denominado como 18:2 $\omega$ -6, geralmente mostrado como 18:2n-6. O nome comum deste ácido graxo é ácido linoléico (AL), ácido fundamental da família n-6 ou  $\omega$ -6. O AL pode ser dessaturado pela inserção de uma dupla ligação entre os carbonos 3 e 4 (contados a partir do terminal metila) formando o ácido  $\alpha$ -linolênico - ALA (18:3n-3), membro da família n-3 ou  $\omega$ -3 (CALDER, 2005). Contudo isto só é possível em plantas e não em mamíferos, pois estes não possuem as enzimas delta 12 e 15 desaturase. Portanto AG das famílias n-3 e n-6 são denominados essenciais e devem ser obtidos através da dieta.

Embora as células dos mamíferos não possam sintetizar o AL e ALA, elas podem metabolizar esses AGs, pela introdução de novas duplas ligações (dessaturação) e pelo alongamento da cadeia (através de alongases). Assim, o AL é posteriormente metabolizado ao ácido  $\gamma$ -linolênico (18:3n-6), e o ácido dihomo- $\gamma$ -linolênico (20:3n-6) em AA (20:4n-6) (FIGURA 9). A mesma série de enzimas usadas para metabolizar os PUFAs n-6, também metabolizam o ALA convertendo-o nos dois principais metabólitos, o EPA (ácido eicosapentaenóico, 20:5n-3) (FIGURA 9), e o DHA (ácido docosahexaenóico, 22:6n-3). Este caminho metabólico a partir do ALA envolve a adição de dois carbonos para formar o ácido docosapentaenóico (22:5n-3), a adição de mais dois carbonos para produzir 24:5n-3, dessaturação para formar

24:6n-3 e remoção de dois carbonos pela  $\beta$ -oxidação limitada formando DHA (FIGURA, 2).

O AA e o EPA quando metabolizados dão origem a eicosanóides através das enzimas ciclooxygenase (COX) e lipoxigenase (LOX). Os eicosanóides são moléculas compostas por 20 átomos de carbonos que desempenham funções específicas na célula, entre as quais, serem potentes sinalizadores que agem como mensageiros de curta duração e distância, afetar os tecidos próximos às células que os produziram (LEHNINGER, 1995).

Os eicosanóides incluem prostaglandinas (PGs), tromboxanas (TXs), leucotrienos (LTs) e ácidos hidroxieicosatetraenóico (HETEs). O AA é tipicamente o substrato dominante para a síntese de eicosanóides. O AA nas membranas celulares pode ser metabolizado por diferentes fosfolipases, mais provavelmente a fosfolipase A2, e o ácido livre pode subseqüentemente atuar como substrato para as enzimas que sintetizam eicosanóides (FIGURA 10).



**FIGURA 9** – Estrutura e metabolismo dos PUFAs n-6 e n-3. (Calder, 2005).

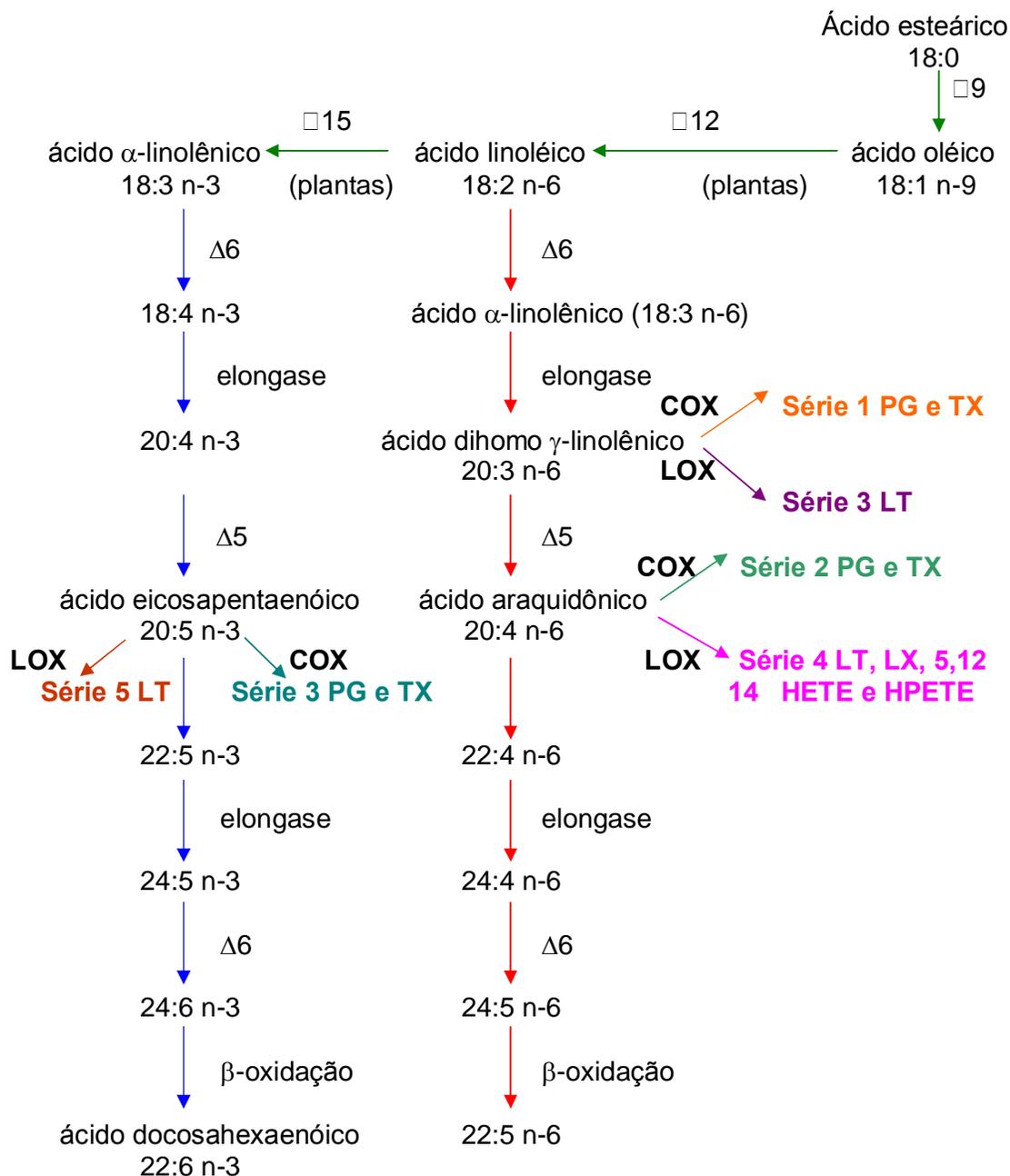
EPA compete com AA pela enzima COX. Existem duas isoformas bem conhecidas de COX: a COX-1, enzima constitutiva; e a COX-2, forma induzível,

presente em estados inflamatórios responsável pela produção aumentada de PG (CALDER, 2005). A atividade da COX e LOX sobre o AA resulta na produção de TXs e PGs da série 2 e LTs da série 4 (FIGURA 10), respectivamente, que tendem a ser pró-inflamatórios e pró-proliferativos em muitos tecidos. A atividade de COX ou LOX sobre o EPA produz uma série diferente de eicosanóides, TXs e PGs da série 3 e LTs da série 5 (FIGURA 10), respectivamente, que tendem a ter ação menos inflamatória e proliferativa (HARDMAN, 2002). EPA é convertido pela COX em tromboxana A<sub>3</sub> (TXA<sub>3</sub>), que é fraco vasoconstritor, diferente da tromboxana (TXA<sub>2</sub>), que é formada sobre a ação da COX sobre o AA e é forte vasoconstritor. Entretanto, a prostaciclina I<sub>3</sub> (PCI<sub>3</sub>), formada a partir do EPA pelo endotélio, é tão potente vasodilatador e inibidor da agregação plaquetária quanto a prostaciclina I<sub>2</sub> (PCI<sub>2</sub>) formada a partir do AA (CALDER 2001a).

A gordura pode regular funções celulares, afetando a expressão ou atividade de genes nas vias de transdução de sinais relacionadas ao controle do crescimento celular e apoptose (CALVANI; BENATTI, 2003).

Nas dietas ocidentais o perfil do consumo de lipídeos atinge de 20 a 40% do valor calórico total ingerido, grande ingestão de ácidos graxos saturados e do tipo trans, e desproporção na ingestão de ácidos graxos essenciais (SIMOPOULOS, 1999a). A dieta moderna do Ocidente contém excesso de PUFAs n-6 (HARDMAN, 2002). O alto consumo de PUFAs n-6 tem sido mostrado induzir vários efeitos fisiológicos e metabólicos (ROSE, 1997; JIANG, BRYCE, HORROBIN, 1998; HILAKIVI-CLARKE et al., 1998):

- 1) aumento da atividade da ornitina descarboxilase na mucosa do cólon, resultando em concentrações aumentadas de poliamina epitelial e aumento da proliferação celular do folículo do cólon;
- 2) aumento da atividade das proteínas kinases (p.ex. proteína kinase C) em glândulas mamárias de roedores e aumento no número de locais de ligação ao receptor de estrogênio.
- 3) aumento das concentrações de prostaglandinas.



**FIGURA 10** – Metabolismo dos ácidos graxos poliinsaturados. Enzimas dessaturases  $\Delta 5$ ,  $\Delta 6$ ,  $\Delta 9$ ,  $\Delta 12$  e  $\Delta 15$ ; COX: ciclooxigenase; LOX: enzima lipooxigenase; PG: prostaglandinas; LT: leucotrienos; TX: tromboxanas; LX: lipoxinas; HETE: ácidos hidroxi-eicosatetraenóico; HPETE: ácidos hidroxiperoxieicosatetraenóico. Adaptado de CALDER, 2001.

Prostaglandinas, tromboxanas, leucotrienos e ácidos graxos hidroxi e hidroxiperoxi estão envolvidos na iniciação e promoção tumoral, proliferação celular, invasão tecidual e metástase. As células tumorais produzem grandes quantidades

de eicosanóides do que suas contrapartes normais. Os eicosanóides derivados do ácido linoléico tem sido ligados ao aumento da proliferação celular e metástase. A observação de que o ácido oléico e PUFAs n-3, especialmente EPA, bloqueiam a reação da desaturase, o primeiro passo da produção de eicosanóides a partir do ácido linoléico, pode parcialmente explicar seus efeitos inibitórios sobre a tumorigênese.

Dietas contendo óleo de milho, com altas concentrações de PUFAs n-6, aumentam a tumorigênese de mama e cólon em roedores, enquanto o óleo de peixe, que é rico em PUFAs n-3, reduz a carcinogênese (ROSE, 1997). Os mecanismos envolvidos incluem a modificação da síntese de eicosanóides. Em células pré-neoplásicas, a fosfolipase A<sub>2</sub>, COX-2 e LOX estão, geralmente, constitutivamente super expressas. Isto leva ao aumento da liberação do AA e sua rápida oxigenação, resultando em altas concentrações de eicosanóides n-6, acompanhadas pela geração de espécies reativas de oxigênio (EROs). Isto pode danificar o DNA e provocar peroxidação lipídica dos PUFAs nas membranas celulares num processo sem fim, levando à várias formas de bases de DNA excíclico e modificações protéicas. Em células se dividindo rapidamente, as mudanças genéticas resultantes e o rompimento de vias de sinalização dirigem as células pré-malignas a instabilidade genética e malignância (CALVANI, BENATTI, 2003). PUFAs n-3 diminuem a produção de eicosanóides e citocinas inflamatórias. O aumento do consumo de PUFAs n-3 reduz a incorporação do AA nas membranas celulares, promovendo resposta antiinflamatória (OH, 2005). A ação antiinflamatória do EPA ocorre, diretamente, substituindo o AA como substrato para eicosanóides e inibindo o metabolismo do AA, e indiretamente, alterando a expressão dos genes inflamatórios através de efeitos sobre a ativação de fatores de transcrição (CALDER, 2005). A inibição do AA pelos PUFAs n-3 também produz potente efeito anti-trombótico pela diminuição da produção de TXA<sub>2</sub> (OH, 2005).

### **1.7 Suplementação com PUFAs N-3 X Caquexia**

O EPA inibe a produção de 15-HETE em resposta ao PIF (FIGURA 6) prevenindo a perda muscular em pacientes com câncer (SMITH; LORITE; TISDALE, 1999). O efeito do PIF produzido por tumores induzindo à caquexia e redução da utilização de glicose por diferentes tecidos e o efeito do pré-tratamento com EPA, foi

estudado por Hussey e Tisdale (1999). Camundongos que receberam uma dose contendo PIF mostraram diminuição considerável do peso corporal (2.3g) em um período de 24 horas e marcada hipoglicemia. Estas foram completamente anuladas pelo pré-tratamento com anticorpo monoclonal para PIF ou por 3 dias com pré-tratamento com EPA. Esses resultados sugerem que além do efeito catabólico direto sobre o músculo esquelético, o PIF tem efeito profundo sobre a utilização de glicose durante a caquexia.

O mecanismo pelo qual o EPA atenua o catabolismo protéico do músculo esquelético no câncer foi investigado por Whitehouse (2001). O músculo sóleo de camundongos portadores de tumor indutor de caquexia (MAC16) apresentou degradação protéica aumentada *in vitro*, quando mensurada pela tirosina liberada, quando comparada com músculos de animais não portadores de tumor. Após incubação sob condições que modificam diferentes sistemas proteolíticos lisossomais cálcio-dependente e proteólise dependente de ATP, catabolismo protéico aumentado foi encontrado. A presença do EPA induziu atenuação da *up-regulation* da expressão do proteosoma em camundongos caquéticos e isto foi correlacionado com aumento na expressão de miosina, confirmando a retenção das proteínas contráteis. EPA também diminuiu o crescimento do tumor MAC16 numa maneira dose-dependente e isto se correlacionou com a supressão da expressão das subunidades- $\alpha$  do proteosoma 20S nas células tumorais, sugerindo que isso possa ser um mecanismo da inibição do crescimento tumoral. Assim, EPA antagoniza a perda de proteínas do músculo esquelético na caquexia do câncer pelo *down-regulation* da expressão do proteosoma e isto pode também ser o mecanismo para inibição do crescimento tumoral.

### **1.8 Suplementação com PUFAs N-3 x Exercício**

O exercício físico é amplamente recomendado como alternativa para redução de peso e melhorar o risco contra hiperlipidemias, bem como o de outros efeitos deletérios do alto consumo de gorduras (BELL; SPENCER; SHERRIFF, 1997). Dietas ricas em óleo de soja (PUFAs n-6) podem causar resistência à insulina. Ao contrário, o óleo de peixe (PUFAs n-3) pode diminuir a resistência periférica à insulina, por induzir a redução das concentrações circulantes de TAGs (JEN et al., 2003). O exercício aeróbico agudo, a suplementação com PUFAs n-3 ou a

combinação de ambos foi demonstrado ser capaz de aumentar a atividade da enzima LPL quando comparada à do pré-tratamento, em homens ativos recreacionalmente. Esse aumento na atividade da LPL pode resultar num aumento na taxa de *clearance* dos triacilgliceróis a partir dos quilomícrons e VLDLs (SMITH, et al., 2004).

Tal qual os PUFAs n-3, o exercício físico pode ter efeitos benéficos sobre as concentrações séricas de TAGs e lipoproteínas. O estudo de Jen et al., (2003), demonstrou que o exercício físico foi capaz de reduzir a resistência periférica à insulina em ratas submetidas à dieta rica em óleo de soja (n-6) e induziu significativa redução nas concentrações sanguíneas de TAGs. A diminuição destes lipídios circulantes provavelmente tornou esses animais mais sensíveis à insulina, que por sua vez poderia explicar o aumento dos estoques de glicogênio no fígado dos animais exercitados. Interessantemente, a associação do exercício físico com dieta com óleo de peixe (n-3) não foi observado efeito somatório ou potencializador de ambos, quanto à diminuição da resistência periférica à insulina observada nesse estudo. Isto demonstra que talvez ambas ações talvez compartilhem a mesma via de transdução de sinais. Esta hipótese deve ser testada. Thomas et al. (2004), examinaram o efeito da combinação de exercício com suplementação de PUFAs n-3 sobre sub-frações lipoprotéicas em humanos ativos. Antes e após o período de suplementação, os indivíduos completaram uma sessão de 60 minutos de exercício em esteira a 60% do  $VO_{2máx}$ . Os autores verificaram um aumento nas concentrações de HDL-C nos dois tratamentos. Contudo, a suplementação com PUFAs n-3 promoveu na sub-fração HDL<sub>2</sub>-C, enquanto o exercício promoveu elevação na sub-fração HDL<sub>3</sub>-C. As combinações da sessão de exercício com administração de óleo de peixe podem ser aditivos para HDL-C, principalmente quando comparadas aos resultados da sessão de exercício agudo.

Em ratas, o exercício físico e o consumo de óleo de oliva (PUFAs n-9) foram muito eficientes em reduzir as concentrações plasmáticas de TAGs e colesterol. O exercício físico associado à alimentação com óleo de girassol (rico em PUFAs n-6) também foi eficiente em reduzir as altas concentrações plasmáticas de TAGs (QUILES et al., 2003). O exercício físico foi capaz de aumentar as concentrações plasmáticas dos PUFAs n-3. Os autores não forneceram nenhuma explicação para tal achado. Concluíram apenas que isso pode contribuir para o estado antitrombótico e a menor produção de prostanóides pró-inflamatórios atribuído ao exercício físico

(QUILES et al., 2003), o que pode ser altamente benéfico para patologias como doenças cardiovasculares e o câncer.

### **1.9 Suplementação com PUFAs N-3 X Sistema Imunitário**

Os AGs modificam a resposta imunitária específica, agindo como mediadores intracelulares e intercelulares. Alterações nas concentrações de lipídios nas dietas podem refletir em modificações nos fosfolipídios das células do sistema imunitário, e a alteração na composição destes ácidos graxos parece influenciar a função das células mononucleares (MNC). Os possíveis mecanismos seriam: primeiramente a composição dos fosfolipídios de membrana se alteram de acordo com o padrão da dieta consumida, o que pode modificar características físicas na membrana, como a fluidez na membrana plasmática dos linfócitos ou de regiões da membrana, alterando a habilidade da célula em responder estímulos; segundo, a alteração na síntese de sinalizadores intracelulares formados a partir dos fosfolipídios de membrana, que poderiam reduzir a afinidade de substratos por enzimas que sintetizam moléculas de sinalização; terceiro, essas moléculas sinalizadoras (as quais incluem prostaglandinas e leucotrienos) são formadas a partir do ácido araquidônico presente na membrana da célula, então reduzindo a concentração sérica deste ácido graxo, como acontece quando as concentrações de ácidos graxos  $\omega$ -3 na dieta aumentam, tem sua formação diminuída; quarto, há indícios de que alguns ácidos graxos  $\omega$ -3 agem diretamente como moléculas sinalizadoras, influenciando a funcionalidade das células; e finalmente, a incorporação de ácidos graxos n-3 na membrana das células pode alterar seu estado redox, também afetando a função celular (CALDER, 1998a; CALDER, 2001).

Calder (2001), em revisão, mostrou que altas concentrações séricas do ácido  $\alpha$ -linolênico ou EPA + DHA foram capazes de diminuir a quimiotaxia de neutrófilos e monócitos, produção de espécies reativas de oxigênio por neutrófilos e monócitos, produção de citocinas pró-inflamatórias por monócitos e linfócitos T, e proliferação de linfócitos T. A redução no total de gordura dietética ingerida (de 40% para 25% do valor calórico total ingerido) resultou em grande aumento na proliferação de linfócitos humanos do sangue em resposta ao mitógeno concanavalina A. Wallace e cols. (2001), demonstraram que a inibição da proliferação de linfócitos T obtidos do baço

de camundongos tratados com diferentes dietas era maior em ratos tratados com óleo de peixe, quando comparada à dos animais suplementados com óleo de açafraão (rico em AG  $\omega$ -6) e óleo de coco (rico em AG saturados). Recentemente, HALL et al. (2005), mostraram que neutrófilos de cachorros que receberam uma dieta enriquecida com óleo de peixe produziram 7.6 vezes mais leucotrienos (LTs) da série 5. LTs da série 5 (FIGURA 10), tendem a ter ação menos inflamatória e proliferativa (HARDMAN, 2002).

## 2 – JUSTIFICATIVA

O câncer é o maior problema de saúde pública dos Estados Unidos e também de outros países desenvolvidos. Atualmente, uma em cada quatro óbitos nos Estados Unidos é devido ao câncer (JEMAL, 2005). No Brasil, as estimativas para o ano de 2005 apontam para 467.440 casos novos de câncer. Os tipos mais incidentes, à exceção do de pele não melanoma, serão os de próstata e pulmão no sexo masculino e de mama e colo do útero para o sexo feminino, acompanhando a mesma magnitude observada no mundo. São esperados 229.610 casos novos para o sexo masculino e 237.830 para sexo feminino. Estima-se que no ano de 2005, o câncer de pele não melanoma (113 mil casos novos) será o mais incidente na população brasileira, seguido pelos tumores de mama feminina (49 mil), pulmão (26 mil), estômago (23 mil) e colo do útero (21 mil) (INCA, 2005).

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, os "hábitos" e o "estilo de vida" adotada pelas pessoas, podem determinar diferentes tipos de câncer (INCA, 2005). A dieta ocidental sofreu grande alteração na ingestão de gorduras, tanto na quantidade quanto nas proporções consumidas de ácidos graxos (FIGURA 1). Dieta rica em PUFAs n-6 leva a um estado fisiológico pró-trombótico e pró-agregador, com aumento da viscosidade sanguínea, vasoespasmos, vasoconstrição (SIMOPOULOS, 1999b), além de promover o aparecimento de câncer através de estímulos em vários estágios no desenvolvimento de câncer de cólon e mama. Em contraste, os PUFAs n-3 tem sido descritos como terem a habilidade de evitar o crescimento tumoral, por influenciar na atividade de enzimas e proteínas relacionadas à sinalização intracelular e proliferação celular (CALDER, 2001a). Ainda, PUFAs n-3 conseguem diminuir e estabilizar a perda de peso em pacientes com câncer de pâncreas.

Alterações no hábito de vida das pessoas como aumento do sedentarismo e exposição crônica a substâncias nocivas, as quais interagem com processos bioquímicos que são controlados geneticamente, também levam a formação de doenças crônicas (LEONARD, 2002). Lee (2003) revisou estudos epidemiológicos sobre atividade física e o risco de desenvolvimento do câncer e demonstrou que homens e mulheres ativos fisicamente têm redução de 30% a 40% no risco do desenvolvimento do câncer de colón, quando comparados com pessoas inativas.

Com relação ao câncer de mama, há evidências razoavelmente claras que mulheres fisicamente ativas têm cerca de 20-30% de redução no risco, quando comparadas a mulheres fisicamente inativas. Parece que 30 a 60 minutos diários de atividade física de intensidade moderada a vigorosa são necessários para reduzir o risco desses dois tipos de câncer.

Cerca de 20-70% dos pacientes com câncer apresentam a síndrome da caquexia (TISDALE, 2004). Estes experimentam fadiga e fraqueza em aproximadamente 70% dos casos (DIMEO; RUMBERGER; KEUL, 1998), que vem acompanhada da perda de tecido muscular, sendo este um fator contribuinte para a morbidade e mortalidade no câncer (TISDALE, 2004; AL-MAJID; McCARTHY, 2001a). A atividade física pode induzir mudanças tanto na via de síntese, quanto na de degradação protéica, sendo que anormalidades em ambas as vias têm sido relacionadas à perda de tecido muscular em indivíduos com câncer (AL-MAJID; McCARTHY, 2001a). Estudos em modelos animais demonstraram que o exercício pode prolongar a vida dos indivíduos treinados e diminuir a taxa de crescimento tumoral (BACURAU et al., 2000).

Ratos portadores do tumor de Walker 256 quando submetidos à suplementação crônica com óleo de peixe tem a taxa de crescimento tumoral e caquexia reduzida (TOGNI et al., 2003; PINTO Jr., 2004), e quando submetidos ao protocolo de treinamento de saltos, durante oito semanas, tem redução do crescimento e da taxa de proliferação tumoral (NUNES, 2005). Não é do nosso conhecimento que haja trabalho investigando o efeito do treinamento de força e da suplementação de óleo de peixe em indivíduos portadores de tumor. Nós aventamos a possibilidade de haver efeito aditivo quanto à ação anti-tumoral e anticaciquética.

### 3 – OBJETIVOS

Uma vez que exercício físico tem a habilidade de promover efeitos benéficos quanto ao câncer e que a suplementação com óleo de peixe também a tem, nosso trabalho tem como objetivo investigar o efeito da suplementação com óleo de peixe, rico em PUFA n-3, associado com o treinamento de saltos sobre o crescimento tumoral, parâmetros de caquexia e imunidade em ratos portadores do tumor de Walker 256.

Para alcançar este objetivo nós investigaremos:

1. O peso corpóreo dos animais;
2. O peso tumoral e o ganho de peso;
3. As concentrações plasmáticas de TAGs;
4. A glicemia e a laticidemia;
5. O peso do baço;
6. A atividade fagocitária dos macrófagos peritoneais e neutrófilos
7. A atividade citotóxica de macrófagos e neutrófilos pela produção de peróxido de hidrogênio.
8. A taxa de proliferação celular de linfócitos associados ao intestino.

## **4 – MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 ENZIMAS, REAGENTES, SOLUÇÕES E ÁCIDOS GRAXOS.**

Enzimas, reagentes e meio de cultura (RPMI 1640) foram obtidos da Sigma Chemical Co., St. Louis USA. O óleo de peixe foi gentilmente doado pela Fundação Herbarium, contendo 1g/cápsula na proporção de 0,192g de EPA e 0,124g de DHA.

Materiais radioativos: O substrato radiomarcado [2- <sup>14</sup>C]-timidina (50mCi/mmol) foi obtido da New England Nuclear Research Products (Du Pont Company – Biotechnology Systems – USA).

### **4.2 ANIMAIS E GRUPOS**

Todos os estudos envolvendo animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do SCB protocolo número 122 (Processo 56207/04-68). Foram utilizados ratos machos albinos adultos (70 dias) da linhagem Wistar mantidos em ciclo claro/escuro (12/12h) e temperatura (23°C ±1) com livre acesso a comida e água. Os animais foram obtidos no Biotério do setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, UFPR – Campus do Centro Politécnico, Curitiba, PR.

Os ratos foram randomicamente divididos em oito grupos: Sedentário sem suplementação (S), Sedentário com suplementação de óleo de peixe (SO), Sedentário portador de tumor (SW), Sedentário portador de tumor suplementado com óleo de peixe (SWO), Exercitado sem suplementação (EX), Exercitado com suplementação de óleo de peixe (EXO), Exercitado portador de tumor (EXW) e Exercitado portador de tumor suplementado com óleo de peixe (EXWO). Após seis semanas de treinamento de saltos, 1mL 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 do tumor, coincidindo com a oitava semana de treinamento, os animais foram ortotansados com sangue e tecidos coletados.

#### **4.2.1 Protocolo de Treinamento**

Foi realizado um período de adaptação ao meio líquido (1/2 hora de natação por dia durante 3 dias, sem utilização de carga). Após os animais dos grupos

exercitados realizaram programa de exercícios que constituiu de saltos em tanque com água, com sobrecarga equivalente à 50% do peso corporal de cada animal (atualizada semanalmente), acoplada ao tórax. A sessão de treinamento constituiu na realização de 10 séries com duração de 30 segundos e com intervalo de 1 minuto entre cada série. Foram feitas 4 sessões semanais de treinamento, com descanso na quarta-feira e fins de semana, durante o período de 8 semanas. Importante ressaltar, que após a inoculação das células tumorais, na sexta semana não houve aumento da carga e o treinamento continuou por mais 2 semanas.

A temperatura da água foi mantida entre 30°C e 32°C. Os saltos foram realizados em tubo de PVC com 250mm de diâmetro, visando limitar a alternativa do animal em seguir para outra direção, favorecendo dessa forma o salto. A profundidade da água foi correspondente a 150% do comprimento corporal do rato (ROGATTO; LUCIANO, 2001, adaptado).

#### **4.2.2 Determinação do peso corpóreo e dos tumores**

Durante o experimento, os animais foram pesados a cada dois dias no período da manhã, sempre antes do treinamento, utilizando-se balança Urano. Após a ortotanasia, o tumor foi retirado e pesado em balança (Denver Instrument XL-410).

#### **4.2.3 Suplementação com óleo de peixe**

A suplementação com óleo de peixe foi feita durante todo o período de treinamento. Foi diária e realizada logo após a sessão de treinamento. A dose utilizada foi equivalente  $1 \text{ g/kg de peso corporal}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$  durante o todo o período de treinamento.

#### **4.2.4 - Ortotanasia dos indivíduos**

Após 8 semanas de treinamento coincidindo com o 15º após a implantação do tumor, foi realizada a ortotanasia dos indivíduos com o auxílio de guilhotina. Este método foi utilizado para facilitar a retirada de grande volume sangue, necessário para as análises séricas e isolamento de células polimorfonucleares.

#### **4.2.5 - Contagem das células: neutrófilos, macrófagos e linfócitos**

A contagem total (número de células por mL) foi feita em câmara de Neubauer utilizando-se 100  $\mu\text{L}$  de suspensão de células em 100  $\mu\text{L}$  de Azul de Tripán. As células que se coraram em azul foram consideradas inviáveis, enquanto que as brilhantes e refringentes a luz, viáveis.

### **4.3 CÉLULAS DO TUMOR DE WALKER 256**

#### **4.3.1 Implantação do Tumor**

O tumor de Walker 256 foi identificado por George Walker em 1928, no *John's Hopkins University School of Medicine*, em glândulas mamárias de uma rata grávida. Em 1953 e 1954 esse tumor foi transplantado em ratos por inoculação subcutânea. O tumor de Walker 256 apresenta 2 subtipos: tipo A metastisante que leva a caquexia terminal dos ratos portadores em aproximadamente 27 dias; e o tipo B que não forma metástases e induz a caquexia precoce do portador, levando a morte em aproximadamente 15 dias (FERNANDES, 1995). Nos experimentos foram utilizados matrizes com o tumor de Walker 256, tipo B, cedido gentilmente pelo Professor Dr. Rui Curi, ICB – USP, mantido pelo Laboratório de Metabolismo Celular da UFPR. Foi injetado intraperitonealmente em um rato macho adulto uma suspensão de  $2 \times 10^7$  células/mL do tumor de Walker 256. Após um período de aproximadamente cinco dias, quando constatado a ascite, o animal foi ortotansiado e injetado 10 mL de solução salina 0,9% em sua cavidade abdominal. Em seguida, foi massageado seu abdome, e através de laparotomia mediana, foi coletado da cavidade abdominal, com pipeta de plástico, o fluido contendo as células tumorais. Foi feita a contagem do número de células tumorais utilizando-se câmara de Neubauer. Após a contagem  $3 \times 10^7$  células (em 1 mL de solução) foram inoculadas subcutaneamente no flanco direito nos animais em experimentação por volta da sexta semana de treinamento.

### 4.3.2 Determinação da massa tumoral

Após o sacrifício o tumor foi retirado e pesado em balança (Denver Instrument XL-410).

## 4.4 ANÁLISES PLASMÁTICAS

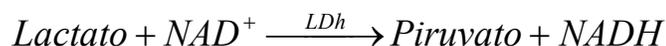
### 4.4.1 - Mensuração da Glicemia

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

### 4.4.2 - Mensuração do Lactato

Foi determinado pelo método enzimático, segundo ENGLE & 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 é agitada em vórtex, centrifugada por 1 minuto a 13.000 rpm em centrífuga Eppendorf modelo 5810R. Em seguida, foram coletados 200 µL do sobrenadante e adicionou-se 4 µL de indicador universal para permitir a visualização da neutralização do soro, pela adição de KOH/TRIS (0,5 M/2 M), sinalizada pela coloração verde, indicando pH 7,0. Deste volume neutralizado pipetou-se 100 µL em tubos de ensaio contendo 1 mL do tampão do ensaio (descrito abaixo) e, após 45 minutos, fez-se leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda 340 nm (Pharmacia 4300 Pro).

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



A partir da medida da absorbância calculou-se a concentração do lactato sérico em µmol/mL, pela fórmula:

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

[Lactato] = concentração de lactato produzida

Abs = Absorbância

6,22 = constante

V = volume da amostra

V1 = volume da amostra + tampão de ensaio

V2 = volume do soro com proteínas + TCA

V3 = volume do soro com proteínas

V4 = volume do soro desproteínizado + volume de neutralização

V5 = volume do soro desproteínizado

#### 4.4.3 - Determinação dos Triacilgliceróis

Foi determinado pelo método enzimático colorimétrico que utiliza quatro enzimas, conforme o sistema comercial BIOTÉCNICA. As amostras foram preparadas seguindo-se as instruções do fabricante, e após a leitura da absorbância em 540nm, a concentração de TAGs foi expressa em mg/dL.

### 4.5 - METODOLOGIAS PARA ENSAIOS UTILIZANDO MACRÓFAGOS

#### 4.5.1 - Obtenção de macrófagos

Para obtenção de macrófagos peritoneais foi removida a pele da região abdominal e então 20mL de tampão fosfato-salina (PBS) pH 7,4, foram injetados na cavidade peritoneal dos animais. Trinta segundos após a administração, a cavidade foi aberta e o fluido, contendo as células, aspirado com a utilização de pipeta de plástico. Em seguida, estas células foram centrifugadas, duas vezes, a 1500 rpm, a 4 °C, durante 10 minutos em centrífuga Eppendorf modelo 5810R.

#### 4.5.2 – Soluções

Solução de tampão fosfato salina pH 7,4, 10 mM (PBS) foi utilizada como meio de diluição para os corantes. O fixador utilizado foi o Baker formol-cálcio (formaldeído 4%, cloreto de sódio 2% e acetato de cálcio 1%). A solução de extração consistiu de ácido acético glacial 1% e etanol 50% em água destilada. A solução estoque do corante vermelho neutro foi preparada pela dissolução de 20 mg de corante em 1 mL de DMSO (dimetil sulfóxido) e a solução para uso de rotina é preparada pela diluição de 20 mL da solução estoque em 5 mL de PBS. A solução de vermelho fenol para os ensaios de produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> consiste de 5,5 mM de dextrose, 0,56 mM de vermelho fenol e 8,5 U/ml peroxidase “horseradish” (Sigma) em PBS pH 7,4 a 340 mOsm, e previamente adiciona-se 0,05% de zymosan (2,3 x 10<sup>8</sup> partículas/mL), para os ensaios de fagocitose. Obtém-se a solução diluindo-se 40 mg de zymosan em 6 mL de PBS e adiciona-se 600 mL de vermelho neutro.

#### 4.5.3 - Atividade fagocítica dos macrófagos

Utilizou-se o método descrito por Bonatto et al. (2005). Da solução peritoneal foram depositados 100 µL contendo 10<sup>5</sup> células em placa de 96 escavações e adicionou-se 10 µL de zymosan corado com vermelho neutro e incubou-se por 30 minutos. Após, foram adicionados 100 µL de fixador. Após mais 30 minutos, a placa foi lavada com PBS e centrifugada por 5 minutos a 1.500 rpm. O vermelho neutro que está dentro dos fagossomos foi então solubilizado utilizando-se 100 µL de solução de extração e após 30 minutos procedeu-se a leitura em leitor de microplacas (Bench Mark –Biorad). Os dados foram expressos em absorbância/ 10<sup>5</sup> células.

#### 4.5.4 - Produção de peróxido de hidrogênio

A produção de peróxido de hidrogênio foi mensurada utilizando-se o método descrito por Bonatto et al. (2004). Através da oxidação de vermelho fenol é possível detectar a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Alíquotas de 100 µL de solução do peritônio contendo 10<sup>5</sup> células e 10 µL de éster de forbol miristato acetato (PMA – 20 µM) foram colocadas nas placas de 96 perfurações. Após 1 hora de incubação no escuro, as

placas foram escorridas e os poços receberam 100  $\mu$ L da solução de vermelho fenol. Incubando-se durante 30 minutos e a leitura realizada a 620 nm em leitor de microplacas (Bench Mark –Biorad). Os dados foram expressos em  $\mu$ mol/  $10^5$  células.

## **4.6 - METODOLOGIAS PARA ENSAIOS UTILIZANDO CÉLULAS POLIMORFONUCLEARES SANGUÍNEAS**

### **4.6.1 - Coleta e separação de células sanguíneas**

O sangue dos indivíduos foi coletado em tubos de ensaio previamente heparinizados e, mantidas sob refrigeração. Após a coleta, o sangue foi submetido ao seguinte protocolo:

1. Centrifugar o sangue no próprio tubo de coleta a 1200 rpm por 10 minutos a 4°C;
2. Aliquotar o plasma;
3. Transferir o restante para um tubo falcon de 50 mL;
4. Colocar o mesmo volume de PBS;
5. Preparar os tubos de vidro (15 mL) com 3 mL de HISTOPAQUE®-1077;
6. Acrescentar 8 mL de sangue diluído com PBS em cima do HISTOPAQUE®-1077;
7. Tampar com parafilm;
8. Centrifugar a 1200 rpm durante 30 minutos a 12°C;
9. Desprezar a fase superior e transferir a camada intermediária para outro tubo – juntar duas camadas intermediárias em cada tubo (volume 2 mL) – Linfócitos e Monócitos; A camada constituída de hemácias e células polimorfonucleares é transferida para um falcon de 50 mL.

### **Polimorfonucleares**

1. Transferir o sedimento de células para 2 tubos Falcon de 50 mL;
2. Completar o volume de 50 mL com Solução hemolítica;
3. Deixar em banho-maria a 37°C por 15 minutos;
4. Centrifugar a 1200 rpm por 10 minutos a 4°C;
5. Desprezar o sobrenadante, se necessário fazer nova lise de hemácias;
6. Ressuspender as células em PBS;
7. Contar em Câmara de Neubauer;

8. Submeter os polimorfonucleares aos experimentos.

Depois de isoladas as células polimorfonucleares, representada em sua maioria pelos neutrófilos que constituem 60% dos leucócitos circulantes (CURI et al., 1998), foram submetidas aos mesmos protocolos dos macrófagos.

#### **4.7 Cultivo dos linfócitos T**

O linfonodo mesentérico dos animais foi retirado, limpo, macerado, e filtrados para a obtenção dos linfócitos. Uma vez isolados os linfócitos,  $2 \times 10^6$  células/mL, foram cultivados em meio de cultura RPMI-1640 enriquecido com 10% de soro fetal bovino e 0,1% de antibióticos (penicilina 10.000 U/mL e estreptomicina 10 mg/L), em placas de 96 poços (volume final de 200  $\mu$ L), a 37° C em atmosfera de 95% ar / 05% CO<sub>2</sub>, por 48 horas. Os linfócitos foram estimulados com 20  $\mu$ L/escavação de solução com o mitógeno Concanavalina A (Con A), estimulador da proliferação de linfócitos T. Após 48 h, foram adicionados 20  $\mu$ l de uma solução contendo (2-<sup>14</sup>C)-Timidina (0,02  $\mu$ Ci/escavação) e as células foram cultivadas por um período adicional de 18 horas, sob as mesmas condições descritas anteriormente.

Após este período, as células linfocitárias foram coletadas automaticamente em coletor múltiplo (Skatron Combi Multiple Cell Harvester, UK) em papéis filtro nº 11731 (Skatron Combi - UK). Neste processo não há necessidade de processos extrativos preparatórios para obtenção de DNA celular. Os discos de papéis contendo a radioatividade incorporada no DNA foram transferidos para *vials* contendo 1 mL de líquido de cintilação e foram levados para mensuração em contador Beckman LS 6500. Os resultados foram expressos em contagens por minuto (CPM). O índice de proliferação dos linfócitos T foi obtido dividindo-se os valores com estímulo (ConA) pelos valores sem estímulo (meio RPMI).

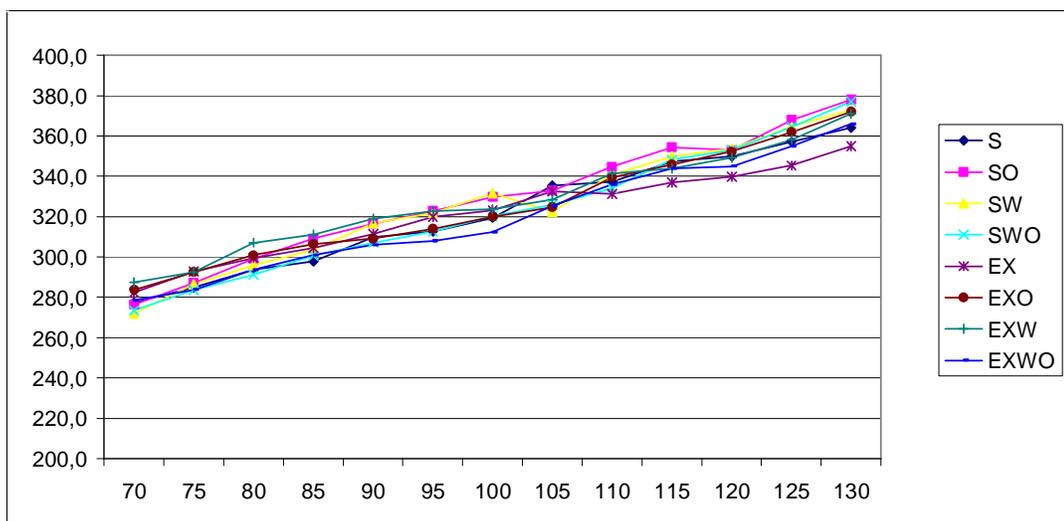
#### **4.7 - Análise estatística**

Os dados serão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM), representativo de pelo menos três experimentos diferentes. Os dados foram submetidos à análise de variância de duas vias (two way ANOVA) com o pós-teste de Bonferroni, com nível de significância para  $P < 0,05$ .

## 5 – RESULTADOS

### 5.1 Variação do peso corporal

Na FIGURA 11 estão apresentadas às variações de peso dos animais no transcorrer do período de experimentação. Todos os animais apresentaram crescimento contínuo e progressivo, não havendo diferença significativa entre os grupos ao final do experimento.



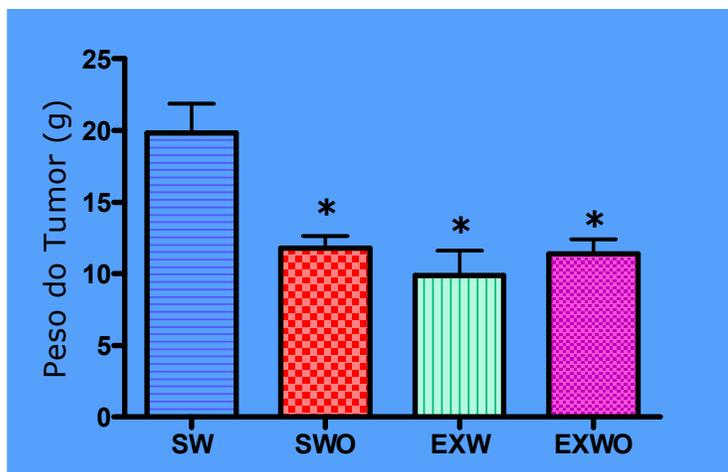
**FIGURA 11** – Evolução do peso corpóreo dos indivíduos dos grupos Sedentário (S), Sedentário suplementado com óleo de peixe (SO), Sedentário portador de tumor (SW), Sedentário portador de tumor suplementado com óleo de peixe (SWO), Exercitado (EX), Exercitado suplementado com óleo de peixe (EXO), Exercitado portador de tumor (EXW), e Exercitado portador de tumor suplementado com óleo de peixe (EXWO). Os dados estão apresentados como média de 9 indivíduos por grupo. O erro padrão da média não foi maior que 15%.

### 5.2 – Parâmetros relativos ao Tumor de Walker 256

#### 5.2.1 - Peso dos Tumores

Na FIGURA 12 está representado o peso do tumor (g) após 15 dias da inoculação do tumor de Walker 256. A massa tumoral teve maior desenvolvimento ( $p < 0,05$ ), no grupo sedentário (SW) pesando  $19,85 \pm 2,03$ . Nos outros grupos (SWO,

EXW e EXWO) o peso do tumor foi de 11g, em média, não havendo diferença significativa entre eles, mas foram estatisticamente diferentes quando comparados ao grupo SW ( $p < 0,05$ ).



**FIGURA 12** – Peso do tumor (g) dos indivíduos dos grupos Sedentário portador de tumor (SW), Sedentário portador de tumor suplementado com óleo de peixe (SWO), Exercitado portador de tumor (EXW) e Exercitado portador de tumor suplementado com óleo de peixe (EXHW). Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 9 indivíduos por grupo. \*  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo SW.

### 5.2.2 – Peso corpóreo após a implantação do tumor

Os dados apresentados na TABELA 2 referem-se ao ganho de peso dos animais antes e após a implantação do tumor de Walker 256. Os animais não portadores de tumor dos grupos sedentário (S) e sedentário suplementado com óleo de peixe (SO) ganharam, respectivamente, 19 e 27 g de peso ao final de 15 dias. O grupo exercitado (EX) e exercitado suplementado com óleo de peixe (EXO) também apresentaram ganho de peso de 15 e 25 g, respectivamente. Tanto no grupo SO e EXO o aumento de peso foi significativamente maior quando comparado ao dos seus respectivos pares não suplementados ( $P < 0,05$ ).

O animal sedentário e portador de tumor (SW), por outro lado, ao final de 15 dias apresentou redução de 4 g no seu peso corpóreo, indicativo de caquexia. A suplementação com óleo de peixe aos animais sedentários e portadores de tumor (SWO) levou a ganho de 12 g na massa corpórea ( $P < 0,05$  vs. SW), O grupo exercitado e portador de tumor (EXW) teve 15 g de ganho de peso, similar à do

grupo EX, mas significativamente maior quando comparado ao do grupo SW ( $P < 0,05$ ). A associação do exercício com suplementação com óleo de peixe (EXWO), também não levou a perda de peso e sim a um ganho de 11,5 g ( $P < 0,05$  vs. SW), similar à do grupo EX e 50% menor que à do grupo EXO ( $P < 0,05$ ).

**TABELA 2** – Peso dos indivíduos antes e 15 dias após a inoculação do tumor, peso dos tumores ao final de 15 dias e ganho de peso nesse período.

	Peso (g) no dia da inoculação do tumor	Peso (g) 15 dias após a inoculação do tumor	Ganho de peso bruto (g) 15 dias após a inoculação do tumor	Peso do tumor (g) 15 dias após a inoculação	Ganho de peso real 15 dias após a inoculação do tumor
<b>S</b>	344,4 ± 9,73	365,3 ± 8,54	19,44 ± 1,17	-	19,44 ± 1,17
<b>SO</b>	350,6 ± 7,21	377,9 ± 8,10	27,33 ± 2,71	-	27,33 ± 2,71 $\alpha$
<b>SW</b>	357,3 ± 13,42	370,4 ± 12,56	13,14 ± 2,09	19,85 ± 2,02	-4,22 ± 1,82*
<b>SWO</b>	352,4 ± 4,80	377,0 ± 3,36	24,63 ± 2,25	11,78 ± 0,08	12,84 ± 2,50
<b>EX</b>	339,8 ± 7,69	354,8 ± 6,70	15,00 ± 1,63	-	15,00 ± 1,63
<b>EXO</b>	346,6 ± 4,88	371,9 ± 4,15	25,33 ± 1,22	-	25,33 ± 1,22 $\beta$
<b>EXW</b>	348,3 ± 11,19	372,3 ± 9,43	24,00 ± 2,17	9,90 ± 1,73	14,13 ± 1,59
<b>EXWO</b>	355,2 ± 10,09	378,1 ± 8,95	22,89 ± 2,55	11,41 ± 1,00	11,48 ± 2,81

\*  $p < 0,001$  quando comparado aos grupos S, SO, SWO, EX, EXO, EXW e EXWO.

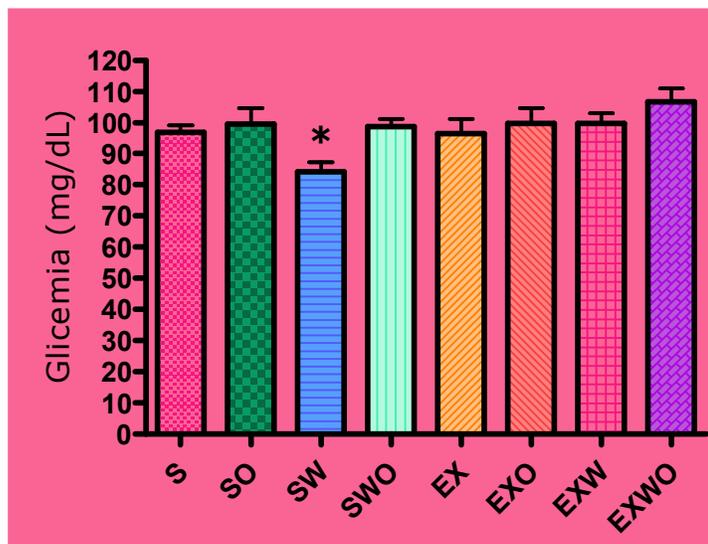
$\alpha$   $p < 0,05$  quando comparado aos grupos S, EX, SWO, EXWO.

$\beta$   $p < 0,05$  quando comparado aos grupos SWO, EX e EXWO.

### 5.3 – Parâmetros sanguíneos

#### 5.3.1 – Glicemia

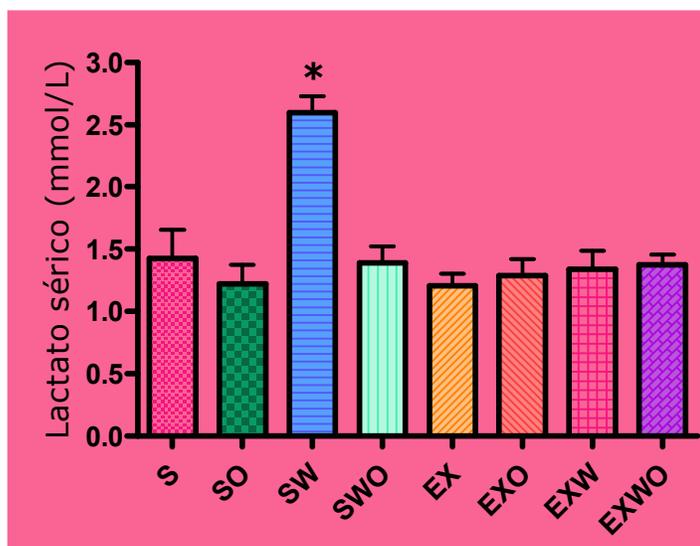
A presença do tumor de Walker 256 induziu a redução significativa da glicemia plasmática do grupo SW ( $P < 0,05$ ) comparado comparada à dos demais grupos (FIGURA 13). No grupo SW, a glicemia foi de 84 mg/dL enquanto nos demais grupos ela foi mantida ao redor de 100 mg/dL.



**FIGURA 13** – Glicemia (mg/dL) dos animais dos grupos Sedentário (S), Sedentário suplementado com Óleo de Peixe (SO), Sedentário portador de tumor (SW), Sedentário portador de tumor suplementado com Óleo de Peixe (SWO), Exercitado (EX), Exercitado suplementado com Óleo de Peixe (EXO), Exercitado portador de tumor (EXW), e Exercitado portador de tumor suplementado com Óleo de Peixe (EXWO). Os dados estão apresentados como média  $\pm$  EPM de 6 (S), 7 (SO), 8 (EX) e 9 (SW, SWO, EXO, EXW, EXWO) indivíduos por grupo. \* $P < 0,05$  quando comparado aos demais grupos.

### 5.3.2 – Laticidemia

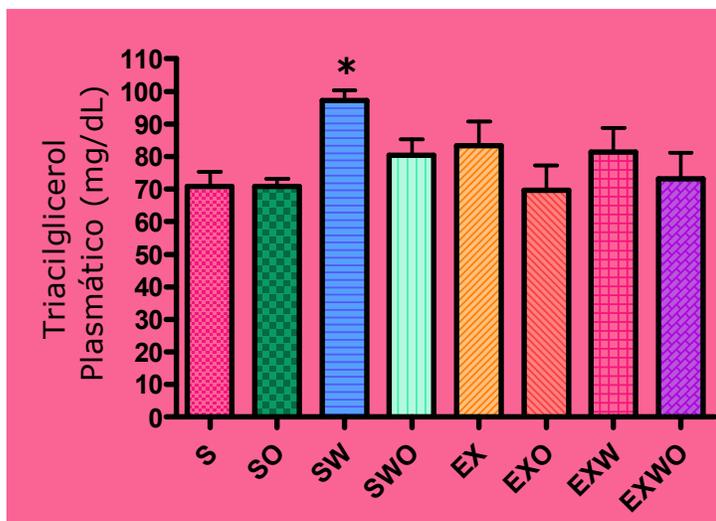
A presença do tumor (SW) elevou a laticidemia em 80% quando comparada à do grupo sedentário (S) (FIGURA 14). Neste a lactacidemia foi de 1,427 mmol/L ( $P < 0,05$ ). A laticidemia nos demais grupos com ou sem tumor, suplementado ou não, não foi diferente entre eles, mas significativamente menor quando comparada à do grupo SW ( $P < 0,05$ ).



**FIGURA 14** – Concentração de lactato sérico (mmol/L) dos animais dos grupos Sedentário (S), Sedentário suplementado com Óleo de Peixe (SO), Sedentário portador de tumor (SW), Sedentário portador de tumor suplementado com Óleo de Peixe (SWO), Exercitado (EX), Exercitado suplementado com Óleo de Peixe (EXO), Exercitado portador de tumor (EXW), e Exercitado portador de tumor suplementado com Óleo de Peixe (EXWO). Os dados estão apresentados como média  $\pm$  EPM de 7 (SW), 8 (S, SO, SWO), e 9 (EX, EXO, EXW, EXWO) indivíduos por grupo. \* $P < 0,05$  quando comparado aos demais grupos.

### 5.3.3 Triacilglicerolemia (TAGs)

A presença do tumor fez com que a concentração plasmática de TAGs aumentasse significativamente, em torno de 40%, no grupo sedentário portador de tumor (SW) quando comparada à do grupo controle (S) (FIGURA 15). A triacilglicerolemia nos demais grupos com ou sem tumor, suplementado ou não, não foi diferente entre eles, mas foi significativamente menor quando comparada à do grupo SW ( $P < 0,05$ ).



**FIGURA 15** – Concentração de Triacilglicerol sérico (mg/dL) dos animais dos grupos Sedentário (S), Sedentário suplementado com Óleo de Peixe (SO), Sedentário portador de tumor (SW), Sedentário portador de tumor suplementado com Óleo de Peixe (SWO), Exercitado (EX), Exercitado suplementado com Óleo de Peixe (EXO), Exercitado portador de tumor (EXW), e Exercitado portador de tumor suplementado com Óleo de Peixe (EXWO). Os dados estão apresentados como média  $\pm$  EPM de 5 (SW) e 7 (S, SO, SWO, EX, EXO, EXW, EXWO) indivíduos por grupo. \* $P < 0,05$  quando comparado aos grupos S, SO, EXO, EXWO.

**TABELA 3** – Resumo dos dados: Glicemia, Lactato e TAGs.

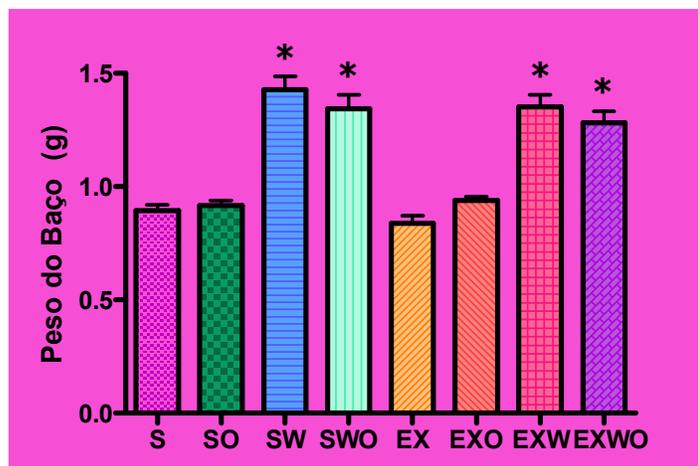
	Glicemia (mg/dL)	Lactato (mmol/L)	TAGs (mg/dL)
<b>S</b>	96,89 $\pm$ 2,31	1,427 $\pm$ 0,23	70,86 $\pm$ 4,41
<b>SO</b>	99,66 $\pm$ 5,10	1,224 $\pm$ 0,15	70,93 $\pm$ 2,22
<b>SW</b>	84,10 $\pm$ 3,15*	2,595 $\pm$ 0,13*	97,10 $\pm$ 3,23 <sup>+</sup>
<b>SWO</b>	98,74 $\pm$ 2,54	1,388 $\pm$ 0,14	80,44 $\pm$ 4,74
<b>EX</b>	96,58 $\pm$ 4,70	1,204 $\pm$ 0,10	83,26 $\pm$ 7,56
<b>EXO</b>	99,80 $\pm$ 4,82	1,285 $\pm$ 0,13	69,73 $\pm$ 7,62
<b>EXW</b>	99,87 $\pm$ 3,12	1,340 $\pm$ 0,19	81,46 $\pm$ 7,33
<b>EXWO</b>	106,7 $\pm$ 4,26	1,375 $\pm$ 0,08	73,10 $\pm$ 8,18

\* $P < 0,05$  quando comparado aos demais grupos.

<sup>+</sup> $P < 0,05$  quando comparado aos grupos S, SO, EXO, EXWO.

#### 5.4 – Peso do Baço

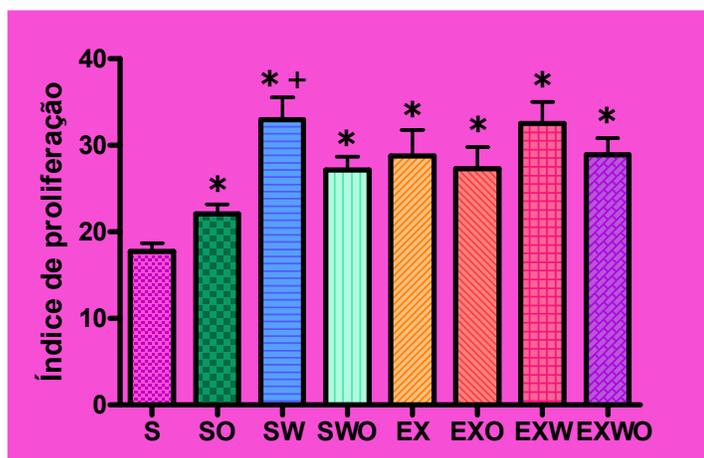
A presença do tumor de Walker 256 provocou aumento médio de 45% no peso do baço (FIGURA 16) de todos os indivíduos (SW, SWO, EXW, EXWO) quando comparado ao dos indivíduos dos grupos sem tumor (S, SO, EX, EXO,  $P < 0,05$ ).



**FIGURA 16** – Peso do baço (g) dos indivíduos dos grupos Sedentário (S), Sedentário suplementado com Óleo de Peixe (SO), Sedentário portador de tumor (SW), Sedentário portador de tumor suplementado com Óleo de Peixe (SWO), Exercitado (EX), Exercitado suplementado com Óleo de Peixe (EXO), Exercitado portador de tumor (EXW), e Exercitado portador de tumor suplementado com Óleo de Peixe (EXWO). Os dados estão apresentados como média  $\pm$  EPM de 9 indivíduos por grupo. \*  $P < 0,05$  quando comparado aos demais grupos sem tumor.

### 5.5. Proliferação celular de linfócitos T

A FIGURA 17 representa a taxa de proliferação dos linfócitos, como índice de proliferação, que significa a proliferação das células quando da presença do mitógeno. Os animais sedentários e suplementados com óleo de peixe (SO) tiveram um incremento de 24,4 % no índice de proliferação ( $P < 0,05$  vs. S). A presença do tumor, nos animais sedentários (SW), induziu aumento de 86% no índice de proliferação dos linfócitos T quando comparado ao grupo S ( $P < 0,05$  vs. S). A presença do tumor no grupo sedentário e suplementado (SWO) provocou também aumento na proliferação de linfócitos, mas esta não diferente da do grupo SW ( $P > 0,05$ ), mas foi maior que à do S ( $P < 0,05$  vs. S). A prática de exercício físico induziu aumentos de no mínimo 62% no índice de proliferação celular de linfócitos T no grupo exercitado (EX) quando comparado ao S ( $P < 0,05$  vs. S). A presença do tumor (EXW), da suplementação (EXO) ou de ambos (EXWO) nos animais exercitados não alterou este parâmetro quando comparado a EX ( $P > 0,05$ ), mas foram significativamente diferentes da do grupo S ( $P < 0,05$  vs. S).



**FIGURA 17** – Índice de proliferação de linfócitos T, obtidos dos indivíduos dos grupos Sedentário (S), Sedentário suplementado com Óleo de Peixe (SO), Sedentário portador de tumor (SW), Sedentário portador de tumor suplementado com Óleo de Peixe (SWO), Exercitado (EX), Exercitado suplementado com Óleo de Peixe (EXO), Exercitado portador de tumor (EXW), e Exercitado portador de tumor suplementado com Óleo de Peixe (EXWO). Os dados estão apresentados como média  $\pm$  EPM de 9 indivíduos por grupo. \* $P < 0,05$  vs. S. + $P < 0,05$  vs. SO.

**TABELA 4** – Resumo dos dados funcionais do peso do baço (em g) e do índice de proliferação de linfócitos T

	Peso do baço (g)	Índice de proliferação de linfócitos T
<b>S</b>	0,89 $\pm$ 0,02	17,72 $\pm$ 0,99
<b>SO</b>	0,92 $\pm$ 0,02	22,04 $\pm$ 1,17*
<b>SW</b>	1,43 $\pm$ 0,06 $\alpha$	32,99 $\pm$ 2,58*+
<b>SWO</b>	1,34 $\pm$ 0,06 $\alpha$	27,18 $\pm$ 1,54*
<b>EX</b>	0,84 $\pm$ 0,03	28,76 $\pm$ 3,02*
<b>EXO</b>	0,94 $\pm$ 0,02	27,30 $\pm$ 2,53*
<b>EXW</b>	1,35 $\pm$ 0,05 $\alpha$	32,52 $\pm$ 2,51*
<b>EXWO</b>	1,28 $\pm$ 0,05 $\alpha$	28,91 $\pm$ 1,96*

\*  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo S.

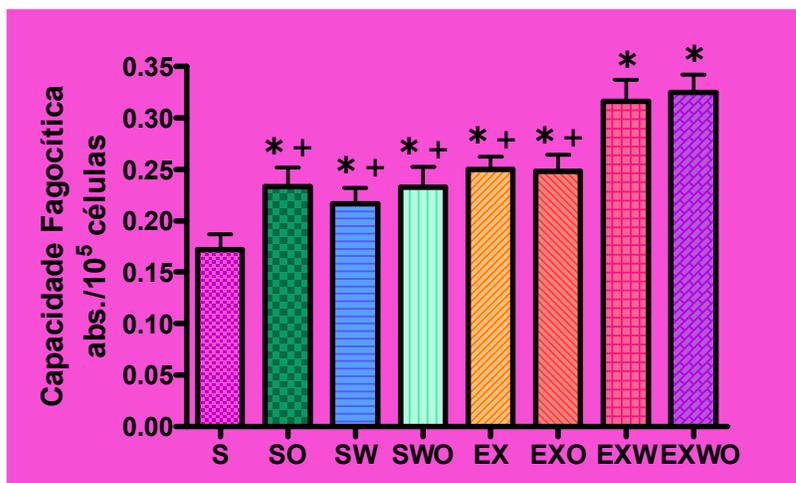
+  $p < 0,05$  quando comparado aos grupos SO.

$\alpha$   $p < 0,05$  quando comparado aos grupos S, SO, EX, EXO.

## 5.6 – Parâmetros Imunitários de Macrófagos Peritoneais

### 5.6.1 – Atividade Fagocítica

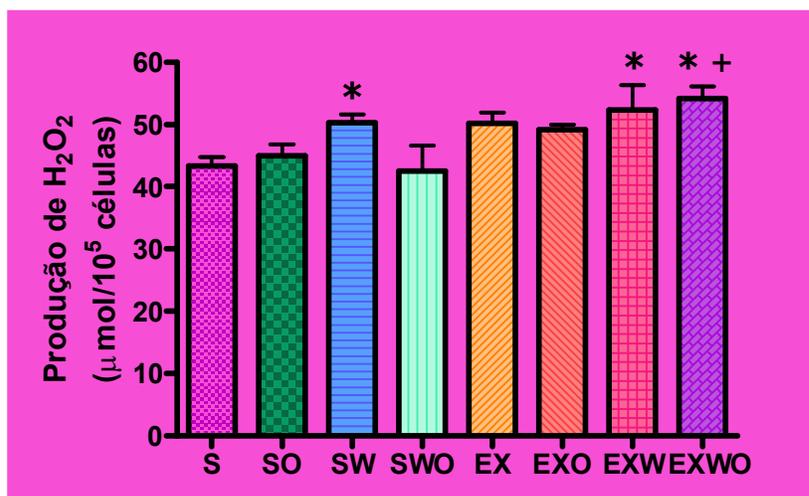
A atividade fagocítica dos macrófagos peritoneais (FIGURA 18) do grupo sedentário sem tumor e sem suplementação (S) foi de 0,190  $\text{abs.}/10^5$  células. Os macrófagos peritoneais obtidos dos animais sedentários que receberam óleo de peixe (SO) apresentaram aumento da capacidade fagocítica de 1,4 vezes comparada à do grupo S. A presença do tumor de Walker também provocou aumento o qual foi similar ao do grupo SO, mas diferente estatisticamente do grupo S ( $P < 0,05$ ). A prática do exercício físico também elevou a capacidade fagocítica quando comparada à do grupo S ( $P < 0,05$ ). Os animais exercitados portadores do tumor de Walker 256 e portadores de tumor suplementados com óleo de peixe (EXWO) e (EXW) apresentaram aumento adicional na capacidade fagocítica, quando comparados a todos os demais grupos, ( $P < 0,05$ ).



**FIGURA 18** – Capacidade Fagocítica dos macrófagos peritoneais obtidos dos indivíduos dos grupos Sedentário (S), Sedentário suplementado com Óleo de Peixe (SO), Sedentário portador de tumor (SW), Sedentário portador de tumor suplementado com Óleo de Peixe (SWO), Exercitado (EX), Exercitado suplementado com Óleo de Peixe (EXO), Exercitado portador de tumor (EXW), e Exercitado portador de tumor suplementado com Óleo de Peixe (EXWO). Os dados estão expressos como média  $\pm$  EPM de 9 indivíduos por grupo. \* $P < 0,05$  vs. S. +  $p < 0,05$  quando comparado aos grupos EXW e EXWO.

### 5.6.2 – Produção de Peróxido de Hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Na figura 19 estão apresentados os dados da produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pelos macrófagos peritoneais. A produção no grupo sedentário sem tumor (S) e suplementado (SO) foi de 43,38  $\mu\text{mol}/10^5$  células. A presença do tumor de Walker 256 induziu a um aumento de aproximadamente 20% nesta produção quando comparada aos grupos S e SO ( $p < 0,05$ ). No grupo com tumor e suplementado (SWO) a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi similar à dos grupos S e SO (42,52  $\mu\text{mol}/10^5$  células). O exercício elevou a produção de peróxido nos grupos exercitados (EX) e exercitado suplementado com óleo de peixe (EXO), contudo esta não foi significativamente diferente quando comparada aos grupos S, SO e SWO ( $P > 0,05$ ). Por outro lado, a presença do tumor nos grupos exercitados suplementados ou não (EXWO e EXW, respectivamente), promoveu aumento na produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a qual foi estatisticamente diferente quando comparada à do grupo S. Ainda o grupo EXWO foi estatisticamente diferentes aos grupos SO e SWO.



**FIGURA 19** – Produção de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) pelos macrófagos peritoneais dos indivíduos dos grupos Sedentário (S), Sedentário suplementado com Óleo de Peixe (SO), Sedentário portador de tumor (SW), Sedentário portador de tumor suplementado com Óleo de Peixe (SWO), Exercitado (EX), Exercitado suplementado com Óleo de Peixe (EXO), Exercitado portador de tumor (EXW), e Exercitado portador de tumor suplementado com Óleo de Peixe (EXWO). Os dados estão apresentados como média  $\pm$  EPM de 9 indivíduos por grupo. \* $P < 0,05$  quando comparado ao grupo S. + $P < 0,05$  quando comparado aos grupos SO e SWO.

O resumo dos dados funcionais dos macrófagos peritoneais está representado na TABELA 5.

**TABELA 5** – Resumo dos dados funcionais dos macrófagos peritoneais representados como absorvância ou  $\mu\text{mol}/10^5$  células.

	<b>Atividade fagocítica (abs./10<sup>5</sup> células)</b>	<b>Produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (<math>\mu\text{mol}/10^5</math> células)</b>
<b>S</b>	0,17 ± 0,01	43,38 ± 1,34
<b>SO</b>	0,23 ± 0,02* <sup>+</sup>	44,95 ± 1,83
<b>SW</b>	0,22 ± 0,01* <sup>+</sup>	50,33 ± 1,31 $\alpha$
<b>SWO</b>	0,23 ± 0,02* <sup>+</sup>	42,52 ± 1,31
<b>EX</b>	0,25 ± 0,01* <sup>+</sup>	50,17 ± 1,80
<b>EXO</b>	0,25 ± 0,02* <sup>+</sup>	49,20 ± 0,78
<b>EXW</b>	0,32 ± 0,02*	52,33 ± 3,95 $\alpha$
<b>EXWO</b>	0,32 ± 0,02*	54,13 ± 1,99 $\alpha\beta$

\*  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo S.

+  $p < 0,05$  quando comparado aos grupos EXW e EXWO.

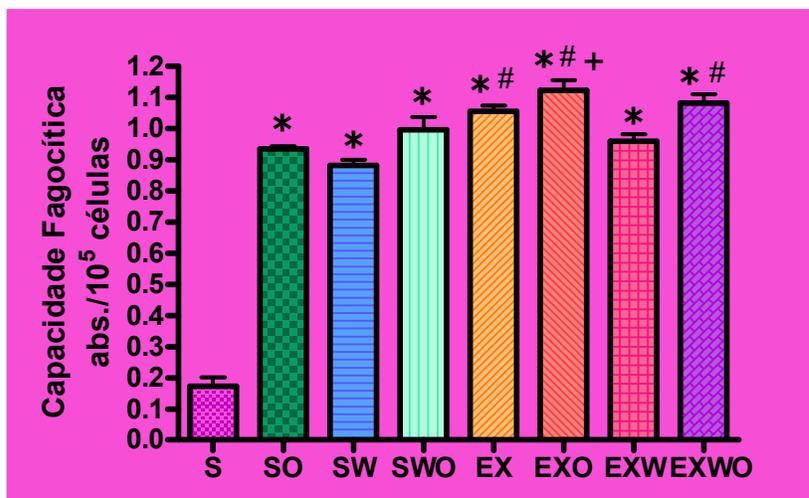
$\alpha$   $p < 0,05$  quando comparado ao grupo S.

$\beta$   $p < 0,05$  quando comparado aos grupos SO e SWO.

## 5.7 – Parâmetros imunitários dos Neutrófilos

### 5.7.1 Capacidade Fagocítica

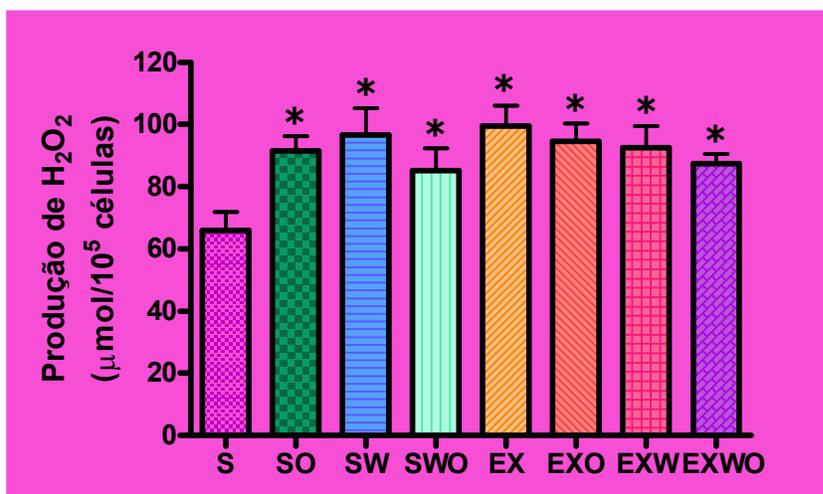
A capacidade fagocítica dos neutrófilos (FIGURA 20) do grupo sedentário foi de  $0,171/10^5$  células, significativamente menor quando comparada à de qualquer outro grupo. O exercício físico induziu a um aumento de 6,2 vezes na capacidade fagocítica pelos neutrófilos do grupo EX quando comparada à do S ( $p < 0,05$ ), 1,14 vezes quando comparada à do SO ( $p < 0,05$ ), 1,20 vezes aa do SW ( $p < 0,05$ ) e 1,10 vezes em relação à do EXW ( $p < 0,05$ ). A capacidade fagocítica desses grupos não diferiu entre si ( $P > 0,05$ ). Quando a suplementação foi associada ao exercício na presença (EXWO) ou ausência (EXO) do tumor, não foi observado efeito adicional ao já provocado pelo exercício físico, e a capacidade fagocítica não diferente daquela observada nos grupos SO, SW e EXWO além da do grupo S. Exercício e suplementação juntos (EXO) provocaram aumento ainda maior da capacidade fagocítica, quando comparada àquela observada no grupo SW ( $P < 0,05$ ).



**FIGURA 20** – Capacidade fagocítica dos neutrófilos obtidos dos indivíduos dos grupos Sedentário (S), Sedentário suplementado com Óleo de Peixe (SO), Sedentário portador de tumor (SW), Sedentário portador de tumor suplementado com Óleo de Peixe (SWO), Exercitado (EX), Exercitado suplementado com Óleo de Peixe (EXO), Exercitado portador de tumor (EXW), e Exercitado portador de tumor suplementado com Óleo de Peixe (EXWO). Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 9 indivíduos por grupo. \* $P < 0,05$  vs. S. # $P < 0,05$  vs, SO, SW e EXW. + $P < 0,05$  vs. SW.

### 5.7.2 Produção de Peróxido de Hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Na FIGURA 21 estão apresentados os resultados da produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pelos neutrófilos circulantes. Houve aumento de 1,4 vezes na produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nos animais suplementados com óleo de peixe quando comparada à do grupo S. Nos demais grupos esse parâmetro também se manteve elevado, sendo que esses grupos (SW, SWO, EX, EXO, EXW, EXWO) apresentaram aumento de 40%, em média, quando comparada à do grupo S ( $P < 0,05$ ), mas não foram diferentes entre si ( $P < 0,05$ ).



**FIGURA 21** – Produção de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) pelos neutrófilos obtidos dos indivíduos dos grupos Sedentário (S), Sedentário suplementado com Óleo de Peixe (SO), Sedentário portador de tumor (SW), Sedentário portador de tumor suplementado com Óleo de Peixe (SWO), Exercitado (EX), Exercitado suplementado com Óleo de Peixe (EXO), Exercitado portador de tumor (EXW), e Exercitado portador de tumor suplementado com Óleo de Peixe (EXWO). Os dados estão apresentados como média ± EPM de 9 indivíduos por grupo. \**P* < 0,05 quando comparado ao grupo S.

A TABELA 6 apresenta a síntese dos dados para os parâmetros funcionais dos neutrófilos.

**TABELA 6** – Resumo dos dados funcionais dos neutrófilos representados como absorvância ou μmol/10<sup>5</sup> células.

	Atividade fagocítica (abs./10 <sup>5</sup> células)	Produção de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (μmol/10 <sup>5</sup> células)
<b>S</b>	0,17 ± 0,03	65,97 ± 5,91
<b>SO</b>	0,93 ± 0,01**	91,58 ± 4,53*
<b>SW</b>	0,88 ± 0,02**	96,64 ± 8,56*
<b>SWO</b>	0,99 ± 0,04**	85,17 ± 7,15*
<b>EX</b>	1,06 ± 0,02*#	99,52 ± 6,62*
<b>EXO</b>	1,12 ± 0,03*#+	94,53 ± 5,75*
<b>EXW</b>	0,96 ± 0,02*	92,44 ± 7,09*
<b>EXWO</b>	1,08 ± 0,03*#	87,40 ± 3,13*

\* *p*<0,05 quando comparado ao grupo S.

# *p*<0,05 quando comparado aos grupos SO, SW e EXW.

+ *p*<0,05 quando comparado ao grupo SWO.

## 6 – DISCUSSÃO

Tem sido estimados 30% de todos os casos de câncer ligados à dieta, onde o consumo excessivo de PUFAs n-6 e a baixa ingestão de PUFAs n-3 podem facilitar o aparecimento de doenças cardiovasculares e câncer (McENTEE; WHELAN, 2002). Vários estudos vêm demonstrando que a dieta com PUFAs n-3, usualmente na forma de óleo de peixe, é capaz de reduzir o crescimento tumoral em vários modelos animais (TAPIERO, 2002; BOUDREAU, et al., 2001; ROBINSON, et al., 2001; PETRIK et al., 2000) e que a atividade física oferece proteção contra malignidades (ZIELINSKI et al., 2004; LEUNG et al., 2004; WESTERLIND et al., 2003; HOFFMAN-GOETZ; HUSTED, 1995). Embora tenha sido sugerido que esses efeitos ocorram via alterações no sistema imunitário (COSTA ROSA, 2004; CURI, 2002) o efeito combinado do exercício com a dieta na redução do crescimento tumoral não tem sido avaliado.

Em nossa abordagem experimental ratos adultos (70 dias) foram suplementados com  $1 \text{ g/kg de peso corporal}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$  de óleo de peixe e submetidos a um protocolo de treinamento de saltos durante 8 semanas. Ao implantarmos o tumor de Walker 256, verificou-se que a suplementação com óleo de peixe rico em PUFAs n-3 e o treinamento de saltos induziram a uma taxa de crescimento menor (40,6% e 50,3%, respectivamente) do tumor quando comparado ao do grupo SW (FIGURA 12). Quando a suplementação foi associada ao treinamento de saltos, o crescimento tumoral foi reduzido (42,5 % comparado a SW,  $p < 0,05$ ), ou seja, não observamos efeito aditivo. Apesar de não termos observado efeito aditivo, uma contribuição importante do nosso trabalho é que nossa abordagem experimental iniciou a suplementação em animais adultos (a partir de 70 dias) e provocou o mesmo efeito observado em animais cuja suplementação fora iniciado a partir do desmame, ou seja, 21 dias (MUND, 2005).

Outros estudos também demonstraram que a dieta com PUFAs n-3, usualmente na forma de óleo de peixe, é capaz de reduzir o crescimento tumoral em vários modelos animais (TAPIERO, 2002; BOUDREAU, et al., 2001; ROBINSON, et al., 2001; PETRIK et al., 2000). Gillis et al. (2002), examinaram a participação do ácido eicosapentaenóico (EPA) como indutor de apoptose e necrose secundária em células humanas promielocíticas HL-60 e demonstraram redução da taxa de crescimento tumoral *in vitro*. Outros estudos também evidenciaram efeitos benéficos

do exercício em animais portadores de tumor. Westerlind et al. (2003) reportaram retardo no crescimento tumoral em ratos que faziam 30 minutos de natação 5 dias por semana durante 8 semanas. Leung et al. (2004), demonstraram que o exercício diminuiu em 27% o crescimento do tumor em pacientes com câncer de próstata e esta redução estava relacionada ao aumento da proteína p53 nas células tumorais destes pacientes. Zielinsk et al. (2004) demonstraram que o exercício pode influenciar o crescimento tumoral, resultando em regressão e atraso no crescimento. A progressão ou regressão do processo neoplásico é regulada por múltiplos fatores como reações inflamatórias, fatores angiogênicos, citocinas e hormônios (BRIGATI, 2002).

Vários mecanismos tem sido propostos para explicar as ações dos PUFAs n-3 na carcinogênese. Entre estes, estão o aumento na taxa de peroxidação lipídica (SPITELLER, 2003), redução na síntese de eicosanóides próinflamatórios (BARBER, 2001; MUND, 2005), ações que envolvam modificação na taxa de transcrição gênica (POMPÉIA, 2000, ARGILÉS, 2003), na sinalização intracelular (WALLACE, 2001; DOMMELS, 2002), a otimização do sistema imunitário (EMERY, 1999). Provavelmente todas estas hipóteses devam estar corretas, pois possivelmente a redução do tumor deva ser resultado da associação de uma série de eventos (CURI et al., 2002). Neste estudo nós avaliamos alguns parâmetros do sistema imunitário.

Para prevenir a proliferação de células tumorais, o sistema imunitário deve reconhecer e destruir essas células. Contrariamente, o sistema imunitário não deve destruir células dos próprios tecidos corporais para prevenir a ocorrência de doenças autoimunes. Assim a regulação do reconhecimento pelas células do sistema imunitário tem papel importante nessas doenças e no câncer (DAS, 2004). Houve aumento do peso do baço nos grupos com tumor (SW, SWO, EXW, EXWO) quando comparado ao dos grupos sem tumor (FIGURA 16). Isto indica que a presença do tumor funciona como estímulo antigênico para o sistema imunitário dos portadores de tumor.

Neutrófilos representam 50-60% do *pool* de leucócitos circulantes, fazem parte da primeira linha de defesa do organismo contra infecções e tem papel importante na resposta imunitária a lesões teciduais (PEAKE, 2002). Macrófagos também fazem parte da imunidade inata e estão envolvidos nas respostas inflamatórias assim como na defesa contra células neoplásicas (LEVEY et al., 2001),

exercendo suas atividades citotóxicas a partir da produção de TNF- $\alpha$  e EROs (KLIMP et al., 2002).

Quando um fagócito é estimulado, a enzima NADPH oxidase (primeira defesa contra agentes invasores) migra para a membrana celular, associando-se a ela e tornando-se ativa. A enzima então transfere elétrons do seu substrato, o NADPH, para o oxigênio gerando o ânion superóxido. Quando o ânion superóxido reage com outro superóxido, tem-se a formação de uma substância estável, o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Quando o  $H_2O_2$  reage com a molécula de ferro ele ganha mais um elétron, formando um radical livre chamado radical hidroxila ( $\cdot OH$ ). O radical hidroxila pode danificar membranas ou partes internas das células, modificar proteínas, como o colágeno e a elastina ou provocar alterações nos ácidos nucleicos (FRIDOVICH, 1998). O aumento na produção de  $H_2O_2$  foi estimulado grandemente pela presença do tumor (FIGURAS 19 e 21). Yaqoob; Calder (1995), investigando macrófagos peritoneais de camundongos alimentados por 8 semanas com 200 g/kg de óleo de peixe, encontraram maior produção de  $H_2O_2$  nos animais com tumor, indicando maior grau de atividade celular (THIES et al., 2001). Em outro estudo, o tratamento com óleo de peixe por 4 semanas também aumentou a produção de  $H_2O_2$  (MIYASAKA et al., 2001).

Outra resposta imunitária importante é o índice de fagocitose (FIGURAS 18 e 20). Nos grupos portadores de tumor, o índice de fagocitose foi elevado, devido à ativação de macrófagos e neutrófilos pela presença do tumor. Em macrófagos, a suplementação com óleo de peixe aumentou a capacidade fagocítica de maneira similar à observada pelo exercício físico. Na presença do tumor, quando o exercício foi (EXWO) ou não (EXWO) associado à suplementação nós observamos um efeito adicional comparado aos controles sedentários (SWO, SW, respectivamente, FIGURA 18). WIESENFELD et al. (2001) sugerem que a adição de PUFAs reduza a adesão de macrófagos, o que provocaria índice de fagocitose maior. Nos neutrófilos, a suplementação com óleo de peixe não promoveu efeito adicional além daquele já desencadeado pelo treinamento de saltos (FIGURA 20). Interessantemente a capacidade fagocítica foi incrementada quando associamos a atividade física e suplementação com óleo de peixe (FIGURA 20, grupo EXO). Isto demonstra que apesar de macrófagos e neutrófilos terem ação fagocítica, o que acontece em uma população não pode ser literalmente transferido para a outra. Outro estudo demonstrou que animais exercitados apresentaram maior ação citotóxica antitumoral

de seus macrófagos (MURPHY et al., 2004). Mudanças no micro ambiente tumoral podem talvez influenciar o crescimento e proliferação das células tumorais. Essas alterações envolvem, possivelmente, a infiltração e atividade de células do sistema imunitário na massa tumoral (ZIELINSK et al., 2004). A presença de células inflamatórias dentro do tumor desencadeia efeitos contraditórios. Por um lado, estas células têm a capacidade de matar as células tumorais, inibindo seu crescimento, e “limpando” os restos das células mortas. Por outro lado, macrófagos e neutrófilos secretam fatores de crescimento e angiogênicos que promovem o crescimento e a proliferação tumoral (BRIGATI, et al., 2002; BALKWILL; MANTOVANI, 2001). Como neste trabalho não isolamos e investigamos o infiltrado leucocitário, não podemos afirmar que a resposta destas células se assemelha à das células circulantes. Esta hipótese deve ser testada.

Além da imunidade inata, mediada por macrófagos e neutrófilos, a defesa do organismo às infecções também envolve os linfócitos - imunidade adquirida. Uma forma de se avaliar a função linfocitária é mensurar a taxa de proliferação dessas células em resposta a um mitógeno, no caso a Con-A. É sabido que PUFAs n-3 tem habilidade imunomoduladora havendo estudos que demonstram efeitos estimulatórios (TREBBLE et al., 2003; MIYASAKA et al., 2001; ROBINSON et al., 2001; YAQOUB; CALDER, 1995) ou inibitórios (THIES et al., 2001a; SANDERSON, et al., 1995; YAQOUB; CALDER, 1995; YAQOUB; NEWSHOLME, 1994; SPERLING, et al., 1993; FRITSCHÉ et al., 1991; KELLEY et al., 1988; ALEXANDER; SMYTHE, 1988). A suplementação dos animais sedentários com óleo de peixe elevou significativamente a proliferação linfocitária (SO) quando comparada à dos animais sem suplementação (FIGURA 17). A explicação para estes diferentes achados está na dose de ácido graxo utilizado onde grandes doses são inibitórias (duplicação ou triplicação da quantidade de gordura ingerida na dieta) e pequenas são imunoestimulatórias. Togni et al (2003), Pinto Jr et al. (2004) demonstraram que a adição de 1 g/kg de peso corpóreo representa 0,1% a mais de gordura na dieta. Portanto, nosso dado de imunoestimulação corrobora esses achados e são explicados pela dose utilizada. A presença do tumor leva a ativação do sistema imunitário, como demonstrado pelos dados de macrófagos e neutrófilos (FIGURAS 18, 19, 20, 21) em que a proliferação celular dos linfócitos T foi grandemente estimulada (FIGURA 17), sendo estatisticamente diferente quando comparada à dos grupos S e SO ( $P < 0,05$ ). A suplementação com óleo de peixe promoveu pequena

redução no índice de proliferação, mas não diferente da do grupo SW, mas foi maior que S. O exercício físico, na ausência ou presença de tumor ou ainda associado à dieta não promoveu alteração no índice de proliferação quando comparado ao grupo SW, mas foram diferentes de S. Como já comentado a atividade física é importante imunomoduladora e possivelmente como o sistema imunitário já estava basalmente com seus linfócitos em proliferação maior que indivíduos sedentários, a presença do tumor não foi hábil em induzir proliferação adicional (FIGURA 17).

Robinson et al. (2001), mostraram que dieta rica em PUFA n-3 exerceu efeitos benéficos na defesa imune contra o tumor mamário R3230AC, incluindo ativação de células T CD8<sup>+</sup>, concomitante à redução em 31% do crescimento tumoral. Aumentos significativos nas concentrações séricas de IL-12 foram observados imediatamente após breve sessão de exercício intenso em ciclo ergômetro. A IL-12 é conhecida por estimular resposta imunitária da resposta tipo Th1, responsável pela atividade citotóxica e anti-tumoral (AKIMOTO et al, 2000; SMITH, 2003). Trebble et al. (2003), mostraram que a suplementação com óleo de peixe em humanos aumentou a proliferação de linfócitos T e a produção de IFN- $\gamma$ , uma citocina produzida pelas células Th1 (AKIMOTO et al, 2000; SMITH, 2003). Estes dados divergem de outros. Para Calder (1998) o consumo de óleo de peixe diminui proliferação de linfócitos T, citotoxicidade mediada por células T, atividade de células NK, quimiotaxia de monócitos e neutrófilos. Animais alimentados com dietas contendo altas concentrações de óleo de peixe (70 a 200 g/kg) apresentaram supressão da proliferação de linfócitos T e B estimulada por mitógeno (SANDERSON, et al., 1995; YAQOUB; CALDER, 1995; YAQOUB; NEWSHOLME, 1994; FRITSCHE et al., 1991; KELLEY et al., 1988; ALEXANDER; SMYTHE, 1988). Em outro estudo foi observada diminuição da proliferação de linfócitos em homens suplementados com 1,2 g por dia de óleo de peixe rico em EPA (THIES *et al*, 2001a). Dietas com óleo de peixe (100 g/kg), resultaram em significativa supressão da lise de células tumorais – alvo de macrófagos peritoneais de camundongos (HUBBARD et al., 1994). A quimiotaxia de neutrófilos foi suprimida seguindo a suplementação com PUFA n-3, em humanos (SPERLING, et al., 1993). Outro estudo investigou a suplementação com óleo de peixe rico em EPA ou em DHA em diferentes funções de neutrófilos, monócitos e linfócitos, em humanos saudáveis. A suplementação com DHA diminuiu a ativação de linfócitos T, avaliada pela expressão de CD69, enquanto a suplementação com EPA não teve efeito. Nenhuma

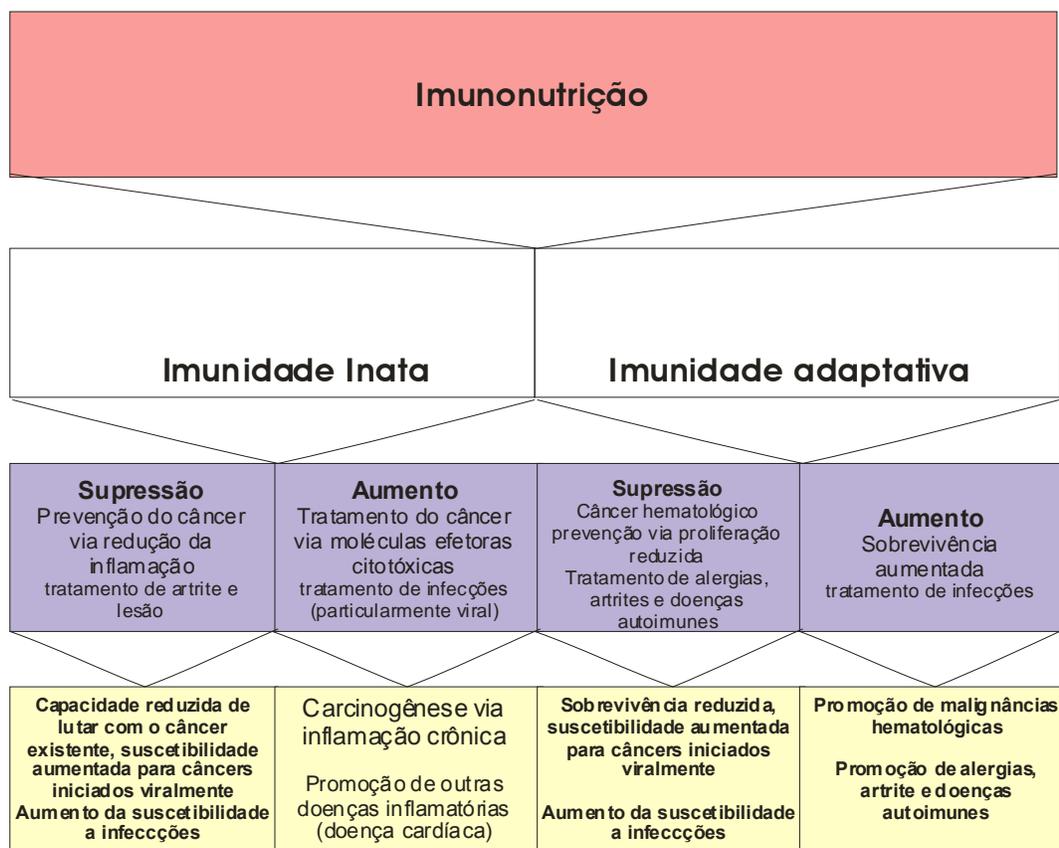
das suplementações teve efeito sobre a fagocitose de neutrófilos e monócitos ou sobre a produção de citocinas ou expressão de moléculas de adesão pelas células mononucleares sanguíneas (KEW et al., 2004). A imunodepressão, resultante de altas doses de óleo de peixe, pode ser importante para o tratamento de doenças caracterizadas por uma superativação do sistema imunitário, tais como as doenças inflamatórias e autoimunes (DE PABLO; CIENFUEGOS, 2000).

Numa outra perspectiva, Robinson e Field (1998) investigaram os efeitos individuais e combinados da suplementação com óleo de peixe e do exercício físico de baixa intensidade (treinamento de natação) nas respostas imunitárias. Eles encontraram que a suplementação com óleo de peixe e o exercício, numa maneira individual e dose-dependente, aumentou a citotoxicidade das células NK, o percentual de células T e B e macrófagos ativados após estimulação com Con A. Os autores sugeriram que os PUFAs n-3 e o exercício tem efeito imunopromotor, porém a combinação dessas variáveis não aumentou os parâmetros imunitários analisados, o que vem de encontro aos resultados obtidos em nosso estudo. Nós hipotetizamos que os resultados obtidos nos parâmetros imunitários analisados poderiam influenciar negativamente o crescimento do tumor de Walker 256 nos indivíduos treinados, o que poderia ajudar a explicar o menor crescimento tumoral encontrado no grupo SWO, EXW e EXWO (FIGURA 12).

O desenvolvimento, manutenção e funcionamento do sistema imunitário dependem de nutrição balanceada e adequada. A deficiência e o excesso de nutrientes afetam o número e atividade das células imunitárias (KELLEY, 2001). Philpott; Ferguson (2004) em uma grande revisão compilaram dados sobre os efeitos dos nutrientes com características farmacológicas, sobre parâmetros imunitários e inflamatórios. A nutrição associada ao sistema imunitário (imunonutrição como referida pelos autores) pode trazer efeitos benéficos (quadros em azul) ou destrutivos (quadros em amarelo) sobre a imunidade inata e adaptativa (FIGURA 22).

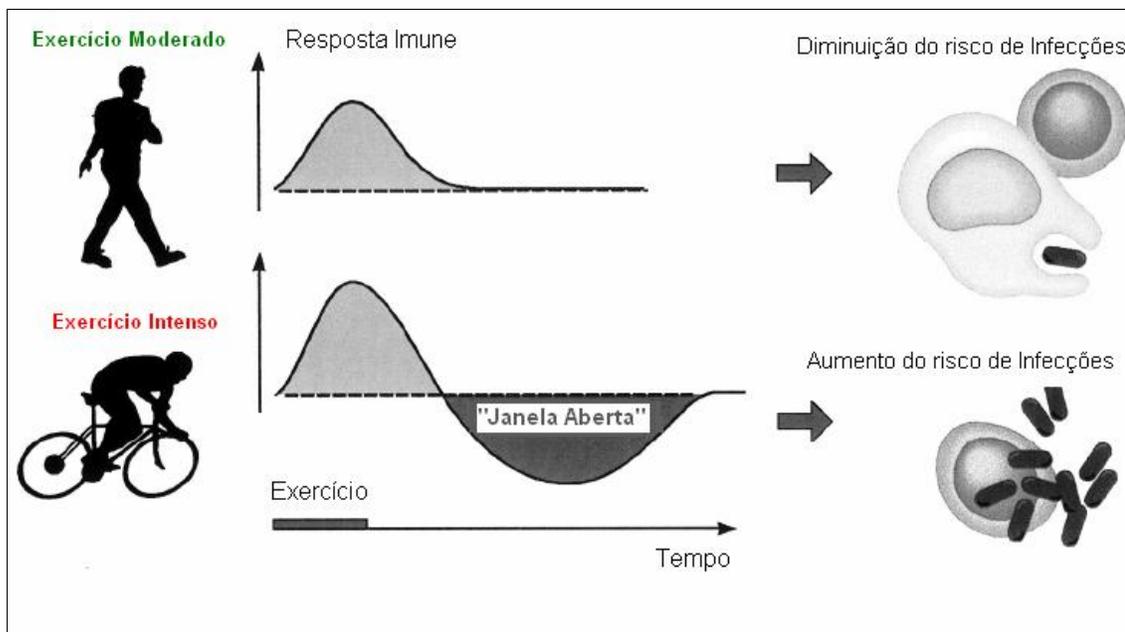
Estudos epidemiológicos dão suporte de que o exercício regular aumenta a resistência à infecções, como resfriados, contudo o exercício em intensidades muito elevadas está associado ao aumento de infecções no trato respiratório superior (NIEMAN; PEDENSEN, 1999). Os mecanismos por trás dos efeitos do exercício sobre o sistema imunitário ainda estão sendo investigados. Duas hipóteses são aventadas: a primeira denominada hipótese metabólica envolve o metabolismo do

aminoácido glutamina e sua importância na função das células imunitárias (CASTELL, 2003; COSTA ROSA, 2004); a segunda considera as mudanças no eixo neuroimunoendócrino (PEDERSEN; TOFT, 2000). Ambas hipóteses precisam ser testadas.



**FIGURA 22** – Efeitos benéficos (quadros em azul) e prejudiciais (quadros em amarelo) de um imunonutriente sobre a imunidade inata e adaptativa, com ênfase nas propriedades relacionadas ao câncer (Philpott; Ferguson, 2004 - modificado).

Durante o exercício moderado e exercício intenso a resposta imunitária é aumentada, mas o exercício intenso é seguido por período de diminuição na capacidade imunitária, onde há uma “janela de oportunidade” para patógenos, que aumenta o risco de infecções (FIGURA 23) (PETERSEN, PEDERSEN, 2002). Essas diferentes relações entre intensidades de exercício e suscetibilidade a infecções virais podem ser expressas pela curva em forma de “J” (FIGURA 24), onde o exercício de intensidade moderada diminui a incidência de infecções enquanto o exercício intenso exerce efeito oposto (NIEMAN, 2000).



**FIGURA 23** – Esquema geral dos efeitos do exercício moderado e intenso sobre a função imune e suscetibilidade a infecção. Durante o exercício moderado e intenso, a resposta imune é aumentada (como mostrada pela mobilização de linfócitos na circulação), mas o exercício intenso é seguido por um período de diminuição na capacidade imune (diminuição na atividade das células NK, proliferação linfocitária, e níveis de imunoglobulina A na saliva), onde há uma “janela aberta” para patógenos (PETERSEN, PEDERSEN, 2002 - modificado).



**FIGURA 24** - Curva em forma de J proveniente da relação entre o nível de atividade física e a resposta imunitária. A prática regular de exercício moderado melhora a função imunitária enquanto o exercício em quantidade excessiva pode causar imunossupressão (NUNES, 2005).

O treinamento de saltos utilizado no nosso trabalho não diminuiu nenhum dos parâmetros imunitários mensurados quando comparados ao do grupo S (TABELAS 4 e 5, FIGURA 21), corroborando dados já apresentados do nosso laboratório (NUNES, 2005). Contudo, as cargas e volumes impostos por esse tipo de treinamento implicam num efeito imunopromotor.

Outro benefício potencial da suplementação com PUFAs n-3 (HARDMAN, 2004) e do exercício físico (WEERT et al., 2005) é seu efeito sobre a caquexia. O estabelecimento da caquexia é detectado pela presença de hipoglicemia, hiperlaticidemia, hipertriacilgliceridemia, redução do conteúdo de glicogênio e perda de peso (PINTO et al, 2004). Todos estes sintomas, exceto o conteúdo de glicogênio, não analisado neste trabalho, foram encontrados nos ratos com tumor não submetidos a treinamento e/ou suplementação (FIGURAS 13, 14, 15 e TABELA 3). Os grupos que realizaram o protocolo de treinamento ou que foram submetidos à suplementação com óleo de peixe tiveram todos esses parâmetros similares quando comparados aos do grupo controle (S) ou melhorados quando em comparação ao grupo SW (TABELA 3). A menor taxa de crescimento tumoral pode explicar a manutenção da glicemia porque o tumor de Walker 256 é ávido consumidor de glicose e produtor de lactato, levando a hiperlaticidemia. Muitas dessas mudanças metabólicas e hormonais observadas durante a caquexia podem ser contrabalançadas pelo exercício regular, que é conhecido por promover mudanças no perfil hormonal de atletas que podem ser sustentadas por mais de 24 horas, e também modular positivamente a resposta imunitária (COSTA ROSA, 2004). O exercício induz a transcrição de genes envolvidos no crescimento, vascularização e metabolismo e estas ações indicam uma gama de mudanças na regulação transcricional, as quais têm papel importante nas respostas de adaptação e mudanças metabólicas musculares (ZAMBON et al., 2003). 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). Como observado na TABELA 3 os grupos exercitados com tumor, EXW e EXHW apresentaram glicemia comparável à dos indivíduos do grupo S. Estes dados corroboram as afirmações de Yaspelkis et al. (2002) sobre a influência do treinamento sobre o metabolismo de carboidratos. Foi sugerido que o metabolismo protéico alterado, assim como diminuição da glutaminemia, influencia a função de linfócitos e a hipoglicemia aumenta as

concentrações dos hormônios relacionados ao estresse e conseqüentemente, reduz a função imunitária (PETERSEN, PEDERSEN, 2002).

O efeito anticatagórico do óleo de peixe foi similar ao encontrado pelo exercício físico (TABELA 3). Os indivíduos do grupo EXW e SWO ganharam 14g e 12,8g, respectivamente, de peso corporal durante os 15 dias da presença do tumor, enquanto os indivíduos sedentários e também portadores de tumor (SW) perderam 4,4 g ao final do experimento (TABELA 2). Nós não encontramos efeito adicional dessas variáveis combinadas (EXWO). O protocolo de exercícios de saltos, em piscina, utilizado no nosso estudo é um exercício resistido, pois este é definido pelo movimento contra algum tipo de resistência. Os indivíduos são obrigados realizar séries de saltos com carga relativa a 50% do peso corporal acoplada ao tronco. É sabido que o exercício de força tem a capacidade de aumentar a massa muscular (SIPILA et al., 2001). Foi demonstrado que pacientes com câncer pancreático tratados com EPA tiveram preservação da massa muscular com ganho significativo de peso, o qual foi atribuído ao aumento da massa corporal magra (BARBER e al., 1999). O efeito do exercício de força na musculatura esquelética é mediado pela ativação de cascatas de sinalização musculares específicas que aumentam a massa muscular, os níveis de proteínas do citoesqueleto e a força de contração sem aumentos significativos do número de miofibrilas (BAAR; ESSER, 1999). O exercício de força, em combinação com a administração do hormônio do crescimento, aumentou as concentrações de *Mechano Growth Factor* (MGF) e da área de secção transversal de músculos de indivíduos idosos. O MGF parece ser bastante relevante para o entendimento e etiologia do desenvolvimento de possíveis tratamentos a doenças onde existe degradação muscular progressiva, incluindo a sarcopenia (HAMEED et al. 2003). Esta hipótese precisa ser testada.

A manutenção do peso corporal encontrada (TABELA 2) tanto nos animais suplementados como nos animais exercitados corrobora um crescente corpo de evidências indicando os benefícios potenciais do exercício físico para melhoria da qualidade de vida de pacientes com câncer (SMITH, 1996; COURNEYA; FRIEDENREICH, 1999; PINTO & MARUYAMA 1999; COURNEYA et al. 2000; COURNEYA 2001; COURNEYA, 2004). Um programa de exercícios bem estruturado pode aumentar a saúde relacionada à qualidade de vida em homens com câncer de próstata (SEGAL et al. 2003). Evidências epidemiológicas mostram que níveis moderados ou altos de atividades físicas de lazer protegem contra câncer

de pulmão em homens e mulheres (TARDON, et al., 2005). Weert e cols. (2005) demonstraram que um programa de reabilitação multidimensional de 15 semanas para sobreviventes de câncer, que inclui exercício físico, exerceu efeitos benéficos relevantes sobre a qualidade de vida relacionada à saúde, capacidade de exercício e força muscular em pacientes com diferentes diagnósticos de câncer.

Diversas pesquisas têm demonstrado que pacientes participando de programas de exercício mantêm alto nível de função física e sofrem menos do estresse psicológico, fadiga e outros sintomas relacionados ao tratamento do que pacientes sedentários durante quimioterapia ou radioterapia (WINNINGHAM & MACVICAR 1988; MACVICAR et al. 1989; DIMEO et al. 1997; SEGAL et al. 2001).

Nossos resultados corroboram os achados de Ramos e colaboradores (2004), que estudaram o efeito da suplementação com PUFAs n-3 sobre o consumo alimentar (número e tamanho de refeições), peso corpóreo, volume e peso tumoral em ratos. O grupo suplementado preveniu a perda de massa corpórea, redução significativa no peso e volume tumoral e atraso no aparecimento dos tumores em relação ao seu controle não suplementado. Os autores ainda demonstraram que a suplementação com PUFAs n-3 foi eficiente em suprimir as citocinas pró-inflamatórias pela expressão gênica diminuída de  $TNF\alpha$  e  $IL-1\beta$  no núcleo arqueado hipotalâmico, na presença do tumor, o que melhorou o consumo alimentar dos animais.

Em doenças crônicas, como o câncer, o exercício físico é uma das estratégias que pode ser adotada para combater a quebra de proteínas (ZINNA, et al., 2003). A proteólise é fator importante para o aumento da perda e da fraqueza muscular, atrasando ou complicando a reabilitação dos pacientes. Essa perda de tecido muscular pode prejudicar as atividades da vida diária e conseqüentemente reduzir a qualidade de vida (INUI, 2002; AL-MAJID & MCCARTHY, 2001b; HESPEL et al., 2001; HASSELGREN & FISCHER, 2001; BRUERA, 1997). Em indivíduos caquéticos a perda de peso corporal (TABELA 2) está associada à presença de fator indutor de proteólise (PIF) secretado pelo tumor (TISDALE, 2000). O uso de anticorpos contra PIF reduziu em 98% a perda de massa magra em camundongos (LORITE, 1997). Barber e colaboradores (2001) mostraram que pacientes após terem consumido suplemento rico em óleo de peixe por 3 semanas, apresentaram significativa queda na produção de IL-6, aumento na concentração sérica de insulina, declínio na proporção cortisol-insulina e diminuição na proporção de pacientes que excretavam

PIF na urina. Em outro estudo, a suplementação com EPA atenuou a degradação protéica e indução do sistema proteolítico ubiquitina-proteosoma pelo PIF, através da interferência com eventos de sinalização intracelular, eventualmente prevenindo a acumulação nuclear do NF- $\kappa$ B (WHITEHOUSE; TISDALE, 2003). Quando ativado, o NF- $\kappa$ B bloqueia a morte celular programada ou apoptose (SCHWARTZ, HERNANDEZ, EVERS, 1999). O NF- $\kappa$ B é geralmente *up-regulated* nas células cancerosas, resultando em resistência dessas células à drogas quimioterápicas ou radiação, e não morrem em resposta a lesão gênica. A família de genes Bcl-2 e a expressão da COX-2 também bloqueiam a apoptose, resultando em células que não morrem em tempo pré-determinado. Os PUFAs n-3 podem restaurar a apoptose funcional (SCHWARTZ, HERNANDEZ, EVERS, 1999), que conseqüentemente *down-regulate* a expressão da COX-2 (CONNOLLY; ROSE, 1998) e os genes da família Bcl-2 (NARAYANAN, NARAYANAN, REDDY, 2001).

Tem sido demonstrado que a degradação de proteína muscular ocorre associada ao aumento das concentrações séricas de PGE<sub>2</sub> (LORITE, 1997), importante fator angiogênico e catalítico envolvido na produção da síndrome da caquexia, em animais portadores do tumor de Walker 256 (LEAVER, et al., 2002). Estudos de MUND (2004) em ratos com tumor de Walker 256 e de TREBBLE et al. (2003), em humanos, suplementando os indivíduos com óleo de peixe, mostraram que nos indivíduos suplementados houve redução significativa da concentração sérica de PGE<sub>2</sub>.

Em resumo, nossos resultados sugerem que a suplementação com óleo de peixe e o protocolo de treinamento de saltos utilizado foram eficazes na redução do crescimento tumoral e exerceram efeito anticaquético. A associação de dieta e atividade física não tiveram efeito adicional nos parâmetros analisados, corroborando os resultados do estudo de Robinson e Field (1998). Nós aventamos a hipótese que o mecanismo responsável pela redução do crescimento tumoral promovido pelo óleo de peixe e exercício físico seja efetuado pela mesma via. Nós examinamos a hipótese de participação do sistema imunitário e não encontramos grandes mudanças o que nos permite sugerir que o sistema de defesa tenha papel coadjuvante, enquanto o PUFAs n-3 e a atividade física desempenhem papel principal neste processo. A vasta gama de tumores existentes, os diferentes protocolos de treinamento assim como a divergência das respostas do hospedeiro *versus* tumor justificam a realização de estudos futuros. Ainda, há necessidade de se

determinar se existem benefícios adicionais ao se estender os programas de exercício de força por mais 12 semanas além de se fazer comparações entre protocolos de exercício aeróbio e de força comparando seus benefícios. Pouco é conhecido sobre essas adaptações e os indivíduos com câncer (SEGAL et al., 2003).

## **7 – CONCLUSÃO**

A suplementação com óleo de peixe e o treinamento de saltos reduziram a taxa de crescimento tumoral, impediram a instalação da caquexia, pois a glicemia, laticidemia, triacilglicerolemia estavam normais e os animais apresentaram ganho de peso. A associação de dieta e exercício não tiveram efeito adicional ao já promovido por ambos isoladamente, o que pode indicar uma via comum de ação. O sistema imunitário foi ativado, contudo não pode sozinho explicar a redução do crescimento tumoral bem como da caquexia.

## 8 – REFERÊNCIAS

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

AKIMOTO, T.; AKAMA, T.; TATSUNO, M.; SAITO, M.; KONO, I. Effect of brief maximal exercise on circulating levels of interleukin-12. **Eur J Appl Physiol**. 81(6): 510-2, 2000.

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.

ALEXANDER, N. J.; SMYTHE, N. L. Dietary modulation of *in vitro* lymphocyte function. **Annals of Nutrition and Metabolism**, 32:192-199, 1988.

AL-MAJID, S. & McCARTHY, D. O. Resistance Training attenuates wasting of the extensor digitorum longus muscle in mice bearing the Colon-26 Adenocarcinoma. **Biological Research for Nursing**, v. 3, p. 155-166, 2001b.

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

American College of Sports Medicine. **Programa de condicionamento físico da ACSM**, 2.ed. São Paulo: Manole, 1999.

ARGILÉS, J. M.; BUSQUETS, S.; LÓPEZ-SORIANO, F. J. The pivotal role of cytokines in muscle wasting during cancer. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**; 37:1609-1619, 2005.

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

BAAR K, ESSER K. Phosphorylation of p70 (S6k) correlates with increased skeletal muscle mass following resistance exercise. **Am J Physiology**. 276(1 Pt 1):C120-7. 1999.

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 Biochemistry and Function**, v. 18, p. 249-258, 2000.

BALKWILL F.; MANTOVANI A. Inflammation and cancer: back to Virchow? **Lancet** Feb 17;357(9255):539-45, 2001.

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

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

BARBER, M. D., FEARON, K. C., TISDALE, M. J., MCMILLAN, D. C., & ROSS, J. A. Effect of a fish oil-enriched nutritional supplement on metabolic mediators in patients with pancreatic cancer cachexia. **Nutrition & Cancer**, 40(2), 118-124, 2001.

BARBER, M.D.; ROSS, J.A.; FEARON, K.C.H. Cancer cachexia. **Surg. Oncology**. 8:133-141, 1999.

BELL, R. R.; SPENCER, M. J.; SHERRIFF, J. L. Voluntary Exercise and Monounsaturated Canola Oil Reduce Fat Gain in Mice Fed Diets High in Fat; **Journal of Nutrition**, 127: 2006-2010, 1997.

BLACK J.M.; NESHEIM M.C. and KINSELLA, J.E.. Dietary level of maize oil affects growth and lipid composition of Walker 256 carcinosarcoma. **British Journal of Nutrition**, v.1, p. 283-294, 1994.

BOECKH-HAEBISCH, E.M., FERNANDES, L.C.; PONZONI, M.; SEELANDER M.C., and CURI, R.. Cationic and water content in blood, skeletal muscle and liver of food restricted and Walker 256 tumor-bearing rats. **Cancer Research Therapy and Control**, v.5, p. 213-219, 1998.

BONATTO, S. J. R.; FOLADOR, A.; AIKAWA, J.; et al. Lifelong exposure to dietary fish oil alters macrophage responses in Walker 256 tumor-bearing rats. **Cellular Immunology**, San Diego-USA, 2005.

BOUDREAU, M.D.; SOHN, K.H.; RHEE, S.H.; LEE, S.W.; HUNT, J.D.; HWANG, D.H. Suppression of tumor cell growth both in nude mice and in culture by n-3 polyunsaturated fatty acids: mediation through cyclooxygenase-independent pathways. **Cancer Research**, v. 61, p. 1386-1391, 2001.

BRIGATI, C.; NOONAN, D.M.; ALBINI, A.; BENELLI, R. Tumors and inflammatory infiltrates: friends or foes? **Clin Exp Metastasis**.;19(3):247-58, 2002 (Abstract).

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

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

CALDAROLA, L.; DEI POLI, G.; DEI POLI, M.; BIGLIANI, S. Notes on the transplantability and dissemination of experimental Walker's sarcomas. **Oncology**, v.10, p. 246-249, 1968.

CALDER, P.C. Immunoregulatory and anti-inflammatory effects of n-3 polyunsaturated fatty acids. **Braz. J. Med. Biological Research**. 31:467-490, 1998.

CALDER, P.C. Dietary fatty acids and the immune system. **Nutr rev.** 56:S70-S83, 1998a.

CALDER, P.C. N-3 Polyunsaturated fatty acids and mononuclear phagocyte function. **Medicinal Fatty Acids in Inflammation**. Edited by J. Kremer, 1998.

CALDER, P.C. N3 Polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity, pourin oil on trouble waters or another fishy tale? **Nutrition Research**, 21, 309-341, 2001a.

CALDER, P.C. Polyunsaturated fatty acids and inflammation. **Biochemical Society Transactions**, v. 33, part 2, 2005.

CALDER, P.C. The effect of dietary fatty acids on the immune response and susceptibility to infection. **Nutrition, Immunity and Infection in Infants and Children**. 45: 137-172, 2001.

CALVANI, M.; BENATTI, P. Polyunsaturated fatty acids. **Sigma-tau S.p.A. – Scientific Department**, 2003.

CARBÓ, N.; BUSQUETS, S.; ROYEN, M. V.; ALVAREZ, B.; LÓPEZ-SORIANO, F. J.; ARGILÉS, J. M. TNF- $\alpha$  is involved in activating DNA fragmentation in skeletal muscle; **British Journal of Cancer**; 86, 1012-1016, 2002.

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

CONNOLLY, J. M. & ROSE, D. P. Enhanced angiogenesis and growth of 12-lipoxygenase gene-transfected MCF-7 human breast cancer cells in athymic nude mice. **Cancer Lett.** 132:107-112, 1998

COOPER, G.M. **A Célula: uma abordagem molecular**. 2ed. Porto Alegre: Artmed, 2001.

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.; BLANCHARD, C.M.; LAING, D.M. Exercise adherence in breast cancer survivors training for a dragon boat race competition: a preliminary investigation. **Psychooncology**, 10 (5):444-52, 2001.

COURNEYA, K.S.; FRIEDENREICH, C.M. Physical exercise and quality of life following cancer diagnosis: a literature review. **Ann. Behav. Med.** 21:171-9, 1999.

COURNEYA, K.S.; KEATS, M.R.; TURNER, A.R. Physical exercise and quality of life in cancer patients following high dose chemotherapy and autologous bone marrow transplantation. **Psychooncology**, 9 (2):127-36, 2000.

COURNEYA, K.S.; SEGAL, R.J.; REID, R.D.; JONES, L.W.; MALONE, S.C.; VENNEN, 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.

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

CURI, R.; et al. Entendendo a gordura: os ácidos graxos. **Manole**, 2002.

CURI, T.C.P.; MELO, M.P.; PALANCH, A.C.; MIYASAKA, C.K.; CURI, R. Percentage of phagocytosis, production of  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$  and NO, and antioxidant enzyme activities of rats neutrophils in culture. **Cell Biochem. Funct.** 16:43-49, 1998.

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

DAS, U. N. Perinatal supplementation of long-chain polyunsaturated fatty acids, immune response and adult diseases. **Med Sci Monit**, 10 (5): HY19-25, 2004.

DE PABLO, M. A.; DE CIENFUEGOS, G. A. Modulatory effects of dietary lipids on immune system functions. **Immunology and Cell Biology** 78, 31–39, 2000.

DIMEO, F.C.; RUMBERGER, B.G.; KEUL, J. Aerobic exercise as a therapy for cancer fatigue. **Med Sci. Sports Exerc.** 30: 475-477, 1998.

DOMMELS, Y.E.M.; ALINK, G.M. van BLADERN P.J., van OMMEN, B. Dietary N6 e N3 polyunsaturated fatty acids and colorectal carcinogenesis, results from cultured colon cells, animals models and human studies. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 2002.

DUNLOP, R.J.; CAMPBELL, C.W. Cytokines and advanced cancer. **J. Pain Symptom Manage.** 20:214-232, 2000.

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

EMERY, P. W. Cachexia in experimental models. **Nutrition**, 15, 7-8, 1999.

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

conditions of L-glutamate, L-Lactate, and other metabolites. **Annals of Biochemistry**, 88:475-484, 1978.

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. Physiology. Endocrinol. Metab.** v.276, p.E721-E727, 1999.

FAURSCHOU, M.; BORREGAARD, N. Neutrophil granules and vesicles in inflammation. **Microbes and Infection**, 5:1317-1327, 2003.

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

FERNANDES, L.C. and CURI, R. Reversion of Walker 256 tumor cachexia by insulin treatment. Possible mechanism involved and perspectives for future research. **Endocrine-Related Cancer**, v.4, p. 1-10, 1997.

FERNANDES, L.C.; NOGUEIRA C.R.; MACHADO, U.F; CARPINELLI, A.R., and CURI, R. Insulin secretion in Walker 256 tumor cachexia. **American Journal of Physiology**, v.258, p. E1033-E1036, 1990.

FRIDOVICH, I. Oxygen toxicity in radical explanation. **J. Exp. Biol.**, 201:1203-1209, 1998.

FRIEDENREICH, C.,AND ORENSTEIN, M. "Physical Activity and Cancer Prevention: Etiologic Evidence and Biological Mechanisms." **Journal of Nutrition** 132: 3456S-3464S, 2002.

FRITSCHKE, K. L.; CASSITY, N. A.; HUANG, S-C. Effect of dietary fat source on antibody production and lymphocyte proliferation in chickens. **Poultry Science**, 70: 611-617, 1991.

GILLIS, R. C.; DALEY, B. J.; ENDERSON, B. L.; KARLSTAD, M. D. Eicosapentaenoic acid and gamma-linolenic acid induce apoptosis in HL-60 cells. **J Surg Res.** Sep; 107 (1):145-53, 2002.

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.

HALL, J. A.; HENRY, L. R.; JHA, S.; SKINNER, M. M.; JEWELL, D. E.; WANDER, R. C. Dietary (n-3) fatty acids alter plasma fatty acids and leukotriene B synthesis by stimulated neutrophils from healthy geriatric Beagles. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.** Nov;73(5):335-41, 2005.

HAMEED, M.; ORRELL, R.W.; COBBOLD, M.; GOLDSPINK, G.; HARRIDGE, S.D. Expression of IGF-I splice variants in young and old human skeletal muscle after high resistance exercise. **J Physiology.** 15;547(Pt 1):247-54, 2003.

HARDMAN, W. E. Omega-3 Fatty Acids to Augment Cancer Therapy. **Journal of Nutrition,** 132:3508S-3512S, 2002.

HARRIS, S.G.; PADILLA, J.; KOUMAS, L.; RAY, D.; PHIPPS, R.P. Prostaglandins as modulators of immunity. **Trends in Immunology,** v. 23, p. 144-150, 2002.

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

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

HILAKIVI-CLARKE L.; STOICA A.; RAYGADA M.; et al. Consumption of a high-fat diet alters estrogen receptor content, protein kinase C activity, and mammary gland morphology in virgin and pregnant mice and female offspring. **Cancer Research;** 58:654-60, 1998.

HILDEBRAND, R.; JANSEN, C.; WOLF, G. Transforming growth factor b stimulates urokinases expression in tumor-associated macrophages of the breast. **Lab Invest.**

78: 59, 1998. In: KLIMP, A.H.; VRIES, E.G.E.; SCHERPHOF, G.L.; DAEMEN, T. A potential role of macrophage activation in the treatment of cancer. **Oncol. Hematol.**, 44: 143-161, 2002.

HOFFMAN-GOETZ, L.; HUSTED, J. Exercise and cancer: do the biology and epidemiology correspond? **Exerc Immunol Rev.** 1: 81–96, 1995.

HUBBARD, N. E.; CHAPKIN, R. S.; ERICKSON, K. L. Effect of dietary linseed oil on tumoricidal activity and eicosanoid production murine macrophages. **Lipids**, 29:651-655, 1994.

HUSSEY, H. J.; TISDALE, M. J. Effect of a cachectic factor on carbohydrate metabolism and attenuation by eicosapentaenoic acid. **Br J Cancer.** Jun;80(8):1231-5, 1999

INUI, A. Cancer anorexia-cachexia syndrome: current issues in research and management. **CA Cancer J Clin.** Mar-Apr; 52(2):72-91, 2002.

JANEWAY, C.A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. **Immunobiology.** 5. ed. Garland Publishing, 2001.

JEMAL, A.; MURRAY, T.; WARD, E.; SAMUELS, A.; TIWARI, R. C.; GHAFOR, A.; FEUER, E. J.; THUN, M. J. Cancer Statistics, 2005. **Cancer J Clin;** 55:10-30, 2005.

JEN, C.; BUISON, A.; PELLIZZON, M.; ORDIZ JR, F.; SANTA ANA, L.; BROWN, J. Differential effects of fatty acids and exercise on body weight regulation and metabolism in female wistar rats. **Exp Biol Med;** 228:843-849, 2003.

JIANG, W. G.; BRYCE, R. P.; HORROBIN, D. F. Essential fatty acids: molecular and cellular basis of their anti-cancer action and clinical implications. **Crit Rev Oncol Hematol;** 27:179-209, 1998.

KELLEY, D.S. Modulation of human immune and inflammatory responses by dietary fatty acids. **Nutrition**, v. 17, p. 669-673, 2001.

KELLEY, D. S. NELSON, G. J. SERRATO, C. M.; SCHMIDT, P. C. BRANCH, L. B. Effects of type of dietary fat on indices of immune status of rabbits. **Journal of Nutrition**, 118:1376-1384, 1988.

KEW, S.; MESA, M. D.; TRICON, S.; BUCKLEY, R.; MINIHANE, A. M.; YAQOUB P. Effects of oils rich in eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on immune cell composition and function in healthy humans. **Am J Clin Nutr.** Apr; 79 (4):674-81, 2004.

KIMBALL, S.R.; FARRELL, P.A.; JEFFERSON, L.S. Invited review: role of insulin in translational control of protein synthesis in skeletal muscle by amino acids or exercise. **J. Appl. Physiol.** 93:1168-1180, 2002.

KLIMP, A.H.; VRIES, E.G.E.; SCHERPHOF, G.L; DAEMEN, T. A potential role of macrophage activation in the treatment of cancer. **Oncol. Hematol.**, **44**: 143-161, 2002.

LEAVER, H. A.; BELL, H. S.; RIZZO, M. T.; IRONSIDE, J. W.; GREGOR, A.; WHARTON, S. B.; WHITTLE, I. R. Antitumour and pro-apoptotic actions of highly unsaturated fatty acids in glioma. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.** Jan; 66 (1):19-29, 2002.

LEE I-MIN. Exercise and physical health: cancer and immune function. **Res. Q. Exerc. Sport.** v.66, p.286-291, 1995.

LEE, I-MIN. Physical Activity And Cancer Prevention – Data From Epidemiologic Studies. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 35, n. 11, p. 1823-1827, 2003.

LEEK, R.D.; LEWIS, C.E.; WHITEHOUSE, R.; GREENALL, M.; CLARKE, J.; HARRIS, A.L. Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma. **Cancer Res.** **56**: 4525, 1996.

LEIGHTON, B.; COOPER, G.J.S. Pancreatic amylin and calcitonin gene-related peptide cause resistance to insulin in skeletal muscle in vitro. **Nature.** v.335, p.632-635, 1989.

LEONARD, W. Food for thoughts. **Scientific American**, December, 74-83, 2002.

LEUNG, P.S.; ARONSON, W. J.; NGO, T.H.; GOLDING, L. A.; BARNARD, R. J. Exercise alters the IGF axis in vivo and increases p53 protein in prostate tumor cells in vitro. **J Appl Physiol**, 96: 450 – 454, 2004.

LEVEY, D.L.; UDONO, H.; HEIKE, M.; SRIVASTAVA, P.K. Identification of a tumor associated contact-dependent activity which reversibly down regulates cytolytic function of CD8+ T cells. **Cancer Immun.** 30;1:5, 2001.

LI, Y-P; SCHWARTZ, R. J.; WADDELL, I. D.; HOLLOWAY, B. R.; REID, M. B. Skeletal muscle myocytes undergo protein loss and reactive oxygen-mediated NF- $\kappa$ B activation in response to tumor necrosis factor  $\alpha$ . **Faseb Journal** 12:871–880, 1998.

LLOVERA, M.; GARCIA-MARTINEZ, C.; AGELL, N.; LOPEZ-SORIANO, F. J.; ARGILES, J. M. TNF can directly induce the expression of the ubiquitin-dependent proteolytic system in rat soleus muscles. **Biochem Biophys Res Commun.** 230:238–244, 1997.

LORITE, M. J.; CARIUK, P.; TISDALE, M. J. Induction of muscle protein degradation by a tumor factor. **Br J Cancer.** 76 (8):1035-40, 1997

MacDONALD, N.; EASSON, A.M.; MAZURAK, V.C.; DUNN, G.P.; BARACOS, V.E. Understanding and managing cancer cachexia. **Journal of American College of Surgeons.** v.3, p.143-161, 2003.

MaCVICAR, M.G., WINNINGHAM, M.L.; NICKEL, J.L. Effect of aerobic interval training on cancer patients: functional capacity. **Nurs. Res.** v.38, p.348-351, 1989.

McENTEE, m. F.; WHELAN, J. Dietary polyunsaturated fatty acids and colorectal neoplasia. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 56:8, 380-387, 2002.

MYIASAKA, C, K.; MENDONÇA, J. R.; NISHIYAMA, A.; ALVES DE SOUZA, J. A.; PIRES DE MELO, M. PITHON-CURI, T. C.; CURI, R. Comparative effects of fish oil given by gavage and fish oil-enriched diet on leukocytes. **Life Sciences** 69: 1739-1751, 2001.

MORLEY, J.E. Anorexia, Sarcopenia, and Aging. **Nutrition**. 17:660-663, 2001.

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

MURPHY, E.A.; DAVIS, J.M.; BROWN, A.S.; CARMICHAEL, M.D.; MAYER, E.P.; GHAFFAR, A. Effects of moderate exercise and oat beta-glucan on lung tumor metastases and macrophage antitumor cytotoxicity. **J Appl Physiol**. 97(3):955-9, 2004.

NARAYANAN, B. A., NARAYANAN, N. K. & REDDY, B. S. Docosahexaenoic acid regulated genes and transcription factors inducing apoptosis in human colon cancer cells. **Int. J. Oncol**. 19:1255-1262, 2001.

NIELSEN, N.H; HANSEN, J.P. Breast cancer in Greenland – selected epidemiological, clinical and histological features. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 98, n. 3, p. 287-299, 1980.

NIEMAN D.C. Is infection risk linked to exercise work load? **Medicine and Science in Sports and Exercise** 32, p. 406-411, 2000.

NIEMAN D.C; PEDERSEN, B.K. Exercise and immune function. Recent developments. **Sports Med**. 27(2):73-80,1999.

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**. v.16, p.334-337, 1995.

NUNES, E. A. Efeitos do treinamento de saltos e da suplementação com beta-hidroxi-beta-metilbutirato (HMB) sobre o crescimento tumoral, caquexia e parâmetros imunitários de ratos portadores do tumor de Walker 256. 2005. **Dissertação de Mestrado**. UFPR, Curitiba/PR.

OH, R. Practical Applications of Fish Oil ( $\Omega$ -3 fatty Acids) in Primary Care. **J Am Board Fam Pract**, 18:28-36, 2005.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Disponível em: <http://www.opas.org.br>. Acesso em 2005.

PASTERNAK, J. J. **Genética Molecular Humana**. Mecanismos de Doenças hereditárias Manole 1.ed. p.365-412, 2002.

PATTERSON, R. E.; NEUHOUSER, M. L.; HEDDERSON, M. M.; SCHWARTZ, S. M.; STANDISH, L. J.; BOWEN, D. J. Changes in diet, physical activity, and supplement use among adults diagnosed with cancer. **Journal of The American Dietetic Association**, v. 103, p. 323-328, 2003.

PEAKE, J.; WILSON, G.; HORDERN, M.; SUZUKI, K.; YAMAYA, K.; NOSAKA, K.; MACKINNON, L.; COOMBES, J. S. Changes in neutrophil surface receptor expression, degranulation, and respiratory burst activity after moderate- and high-intensity exercise. **J Appl Physiol** 97: 612–618, 2004.

PEDERSEN, B.K.; TOFT, A.D. Effects of exercise on lymphocytes and cytokines. **Br. J Sports Med.** 34:246-51, 2000.

PETERSEN, E. W.; PEDERSEN, B. K. Exercise and Immune Function – Effect of Nutrition. **CAB International**, 2002.

PETRIK, M.B.H.; McENTEE, M.F.; CHIU, E.H.; WHELAN, J. Antagonism of Arachidonic Acid is linked to the Antitumorigenic Effect of Dietary Eicosapentaenoic acid in Apc<sup>Min/+</sup> Mice. **Journal of Nutrition**, v, 130, p. 1156-1158, 2000.

PHILPOTT, M.; FERGUSON, L. R. Immunonutrition and cancer. **Mutation Research**, 551, p. 29-42, 2004.

PINTO JR., J. A.; FOLADOR, A.; BONATO, S.; AIKAWA, J.; YAMAZAKI, R. K.; PIZATO, N.; FACIN, M.; GROHS, H.; OLIVEIRA, H.; NALIWAIKO, K.; FERRAZ, A.; NISHIYAMA, A.; FERNANDEZ, R.; CURI, R.; FERNANDEZ, L. C. Fish oil supplementation in f1 generation associated to naproxen, clenbuterol and insulin administration reduce growth and cachexia in Walker 256 tumor-bearing rats. **Journal of Nutritional Biochemistry**, 15:358-365, 2004.

PINTO, B.M.; MARUYAMA, N.C. Exercise in the rehabilitation of breast cancer survivors. **Psycho oncology**. May-Jun;8(3):191-206, 1999.

POMPÉIA, C.; LOPES L. R.; MIYASAKA, C. K.; PROCOPIO, J.; SANNOMIYA, P.; CURI, R. Effect of fatty acids on leukocyte function. **Braz J Med Biol Res**. Nov; 33 (11):1255-68. 2000.

QUILES, J. L.; HUERTAS, J. R.; OCHOA, J. J.; BATTINO, M.; MATAIX, J.; MAÑAS, M. Dietary Fat (Virgin Olive Oil or Sunflower Oil) and Physical Training Interactions on Blood Lipids in the Rat. **Nutrition**, 19:363–368, 2003.

RAMOS, E. J. B.; MIDDLETON, F.A.; LAVIANO, A.; SATO, T.; ROMANOVA, I.; DAS, U. N.; CHEN, C.; QI, Y.; MEGUID, M. M. Effects of Omega-3 Fatty Acid Supplementation on Tumor-Bearing Rats. **J Am Coll Surg**; 199:716–723, 2004.

ROBINSON, L. E.; CLANDININ, M. T.; FIELD, C. J. R3230AC rat mammary tumor and dietary long-chain (n-3) fatty acids change immune cell composition and function during mitogen activation. **J Nutr**. Jul;131(7):2021-7, 2001.

ROBINSON, L. E.; FIELD, C. J. Dietary Long-Chain (n-3) Fatty Acids Facilitate Immune Cell Activation in Sedentary, but not Exercise-Trained Rats. **J. Nutr**. 128: 498–504, 1998.

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.

ROSE, D. P. Effects of dietary fatty acids on breast and prostate cancer: evidence from in vitro experiments and animal studies. **Am J Clin Nutr**; 66:1513S-22S, 1997.

ROYNETTE, C. E.; CALDER, P. C.; DUPERTUIS, Y. M.; PICHARD, C. N-3 polyunsaturated fatty acids and colon cancer prevention. **Clin Nutr**. Apr; 23 (2):139-51, 2004.

SANDERSON, P.; YAQOUB, R.; CALDER, P. C. Effects of dietary lipid manipulation upon rat spleen lymphocyte functions and the expression of lymphocyte surface molecules. **Journal of Nutritional and Environmental Medicine**, 5: 119-132, 1995.

SCHWARTZ, S. A., HERNANDEZ, A. & EVERS, B. M. The role of NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B proteins in cancer; implications for novel treatment strategies. **Surg. Oncol.** 8:143-153, 1999.

SEGAL, R.J.; REID, R.D.; COURNEYA, K.S.; MALONE, S.C.; PARLIAMENT, M.B.; SCOTT, C.G.; VENNER, P.M.; QUINNEY, H.A.; JONES, L.W.; SLOVINEC D'ANGELO, M.E.; WELLS G.A. Resistance Exercise in Men Receiving Androgen Deprivation Therapy for Prostate Cancer. **J Clin Oncol.** 1: 1653-59, 2003.

SIMOPOULOS, A.P. Essential fatty acids in health and chronic disease. **American Journal of clinic Nutrition**, 70, 560S-569S, 1999a.

SIMOPOULOS, A.P. Evolutionary aspects of  $\Omega$ -3 fatty acids in the food supply. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, 6(5-6), 421-429, 1999b.

SIPILA, S.; TAAFFE, D.R.; CHENG, S.; PUOLAKKA, J.; TOIVANEN, J.; SUOMINEN, H. Effects of hormone replacement therapy and high-impact physical exercise on skeletal muscle in post-menopausal women: a randomized placebo-controlled study. **Clin Sci (Lond)**.101(2):147-57, 2001.

SMITH, B. K.; SUN, G. Y.; DONAHUE, O. M.; THOMAS, T. R. Exercise Plus n-3 Fatty Acids: Additive Effect on Postprandial Lipemia. **Metabolism**, v.53, n.10: p.1365-1371, 2004.

SMITH, H. J.; LORITE, M. J.; TISDALE, M. J. Effect of a cancer cachectic factor on protein synthesis/degradation in murine C2C12 myoblasts: modulation by eicosapentaenoic acid. **Cancer Research**; 59 (21):5507-5513, 1999.

SMITH, J.A.; GRAY, A.B.; PYNE, D,B,.; BAKER, M.S.; TELFORD, R.D.; WEIDEMANN, M.J. Moderate exercise triggers both priming and activation of neutrophil subpopulations. **Am J Physiol.** 270(4 Pt 2):R838-45,1996.

SMITH, L. Overtraining, excessive exercise, and altered immunity: is this a T helper-1 versus T helper-2 lymphocyte response? **Sports Med.**33(5):347-64, 2003.

SPERLING, R. I.; BENINCASO, A. L.; KNOELL, C. T.; LARKIN, J. K.; AUSTEN, K. F.; ROBINSON, D. R. Dietary  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acids inhibit phosphoinositide

formation and chemotaxis in neutrophils. **Journal of Clinical Investigation**, 91:651-660, 1993.

SPITELLER, G. Are lipid peroxidation processes induced by changes in the cell wall structure and how are these processes connected with diseases? **Med Hypotheses**. Jan; 60 (1):69-83, 2003.

SUNDERKOTTER, C.; STEINBRINK, K.; GOEBELER, M.; BHARDWAJ, R.; SORG, C. Macrophages and angiogenesis. **J Leukoc Biol**. **55**:410-420, 1994.

TAMAKI, T.; UCHIYAMA, S.; NAKANO, S. A weight-lifting exercise model for inducing hypertrophy in the hind limb muscles of rats. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 24, n. 8, p. 881-886, 1992.

TAPIERO, H.; NGUYEN BA, G.; COUVREUR, P.; TEW, K.D. Polyunsaturated fatty acids (PUFA) and eicosanoids in human health and pathologies. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 56, p. 215-222, 2002.

TARDON A.; LEE, W. J.; DELGADO-RODRIGUEZ, M.; DOSEMECIM.; ALBANES, D.; HOOVER, R.; BLAIR, A. Leisure-time physical activity and lung cancer: a meta-analysis. **Cancer Causes Control**. 16(4): 389–397, 2005.

TASHIRO, T.; YAMAMORI, H.; TAKAGI, K.; HAYASHI, N.; FURUKAWA, K.; NAKAJIMA, N. n-3 Versus n-6 polyunsaturated fatty acids in critical illness. **Nutrition**, **14**: 551-553, 1998.

TAYEK, A.J. A review of cancer cachexia and abnormal glucose metabolism in humans with cancer. **J. Am. Coll. Nutr.** 4:445-446, 1992.

THEOLOGIDES, A. Cancer cachexia. **Cancer**. v.43 (5 Suppl), p.2004-2012, 1979.

THIES, F.; NEBE-VON-CARON, G.; POWELL, J.R.; YAQOUB, P.; NEWSHOLME, E.A.; CALDER, P.C. Dietary supplementation with eicosapentaenoic acid, but no with other long chain n-3 or n-6 polyunsaturated fatty acids, decreases natural killer cell activity in healthy subjects aged >55y. **Journal of Nutrition**, 73, 539-548, 2001.

THIES, F., NEBE-VON-CARON, G., POWELL, J.R., YAQOUB, P., NEWSHOLME, E.A., CALDER, P.C. Dietary supplementation with  $\alpha$ -linolenic acid or with fish oil decreases T lymphocyte proliferation in healthy older humans. **J. Nutr.**, v. 131, p. 1918-1927, 2001a.

THOMAS, T. R.; SMITH, B. K.; DONAHUE, O. M.; ALTENA, T. S.; JAMES-KRACKE, M.; SUN, G. Y. Effects of Omega-3 Fatty Acid Supplementation and Exercise on Low-Density Lipoprotein and High-Density Lipoprotein Subfractions. **Metabolism**, v.53, n.6 (June), p. 749-754, 2004.

THOMPSON, M.P.; KOONS, J.E.; TAN, E.T.H.; GRIGOR, M.R. Modified lipoprotein lipase activities, rate of lipogenesis, and lipolysis as factors leading lipid depletion in C57BL mice bearing the preputial gland tumor ESR-586. **Cancer Res.** v.41, p.3228-32232, 1981.

TISDALE, M. J. The 'cancer cachectic factor'. **Support Care Cancer**, v. 11, n. 2, p. 73-78, feb. 2003.

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

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

TISDALE, M.J. Biology of Cachexia. **J Natl Cancer Inst**; 89:1763-1773, 1997.

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

TOGNI, V.; OTA, C.C.C.; FOLADOR, A.; et al. Cancer cachexia and tumor growth reduction in Walter 256 tumor-bearing rats supplemented with n-3 polyunsaturated fatty acids for one generation. **Nutrition and Cancer**, 46:52-58, 2003.

TREBBLE, T. M.; WOOTTON, S. A.; MILES, E. A.; MULLEE, M.; ARDEN, N. K.; BALLINGER, A. B.; STROUD, M. A.; BURDGE, G. C.; CALDER, P. C. Prostaglandin E2 production and T cell function after fish-oil supplementation: response to antioxidant co supplementation. **Am J Clin Nutr**, 78:376–82, 2003.

TREBBLE, T. M.; WOOTTON, S. A.; MILES, E. A.; MULLEE, M.; ARDEN, N. K.; BALLINGER, A. B.; STROUD, M. A.; BURDGE, G. C.; CALDER, P. C. Prostaglandin E2 production and T cell function after fish-oil supplementation: response to antioxidant co supplementation. **Am J Clin Nutr.** Sep; 78 (3):376-82, 2003.

WALLACE, F. A.; MILES, E. A.; EVANS, C.; STOCK, T.; YAQOOB, P.; CALDER, P. Dietary fatty acids influence the production of Th1 – but no Th2 – type cytokines. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 69, p. 449-457, 2001.

WEERT T. E.; HOEKSTRA-WEEBERS J.,; GROU, B.; OTTER R., ARENDZEN. H.J.; POSTEMA K.; SANDERMAN R.; SCHANS C. A multidimensional cancer rehabilitation program for cancer survivors: Effectiveness on health-related quality of life **Journal of Psychosomatic Research** 58, p. 485– 496, 2005.

WESTERLIND, K. C. Physical Activity And Cancer Prevention – Mechanisms. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 35, n. 11, p. 1834-1840, 2003.

WHITEHOUSE, A. S.; SMITH, H. J.; DRAKE, J. L.; et al. Mechanism of attenuation of skeletal muscle protein catabolism in cancer cachexia by eicosapentaenoic acid. **Cancer Research**; 61(9):3604-3609, 2001.

WHITEHOUSE, A. S.; TISDALE, M. J. Increased expression of the ubiquitin-proteasome pathway in murine myotubes by proteolysis-inducing factor (PIF) is associated with activation of the transcription factor NF-kappaB. **Br J Cancer.** Sep 15;89(6):1116-22, 2003.

WIESENFELD, P.W.; BABU, U.S.; O'DONNELL, M.W.; Effect of long-chain fatty acids in the culture medium on fatty acid composition of WEHI-3 and J774A.1 cells. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 128:123-134, 2001.

WINNINGHAM, M.L.; MacVICAR, M.G. The effect of aerobic exercise on patient reports of nausea. **Oncol. Nurs.** Forum, v.15, p.447-450, 1988.

YAQOOB, P.; CALDER, P. C. Effects of dietary lipid manipulation upon inflammatory mediator production by murine macrophages. **Cell Immunology**, 163: 120-128, 1995.

YAQOOB, P.; CALDER, P. C. Effects of dietary lipid manipulation on the production of murine T-cell-derived cytokines. **Cytokine**, 7:548-553, 1995a.

YAQOOB, P.; NEWSHOLME, E. A.; CALDER, P. C. The effect of dietary lipid manipulation on lymphocyte subsets and proliferation. **Immunology**, 82:603-610, 1994.

YASPELKIS, B.B. 3RD; SINGH, M.K.; TREVINO, B.; KRISAN, A.D.; COLLINS, D.E. Resistance training increases glucose uptake and transport in rat skeletal muscle. **Acta Physiol Scand**. Aug;175(4):315-23, 2002.

ZAMBON, A.C.; MCDEARMON, E.L.; SALOMONIS, N.; VRANIZAN, K.M.; JOHANSEN, K.L.; ADEY, D.; TAKAHASHI, J.S.; SCHAMBELAN, M.; CONKLIN, B.R. Time- and exercise-dependent gene regulation in human skeletal muscle. **Genome Biol.**;4(10):R61, 2003.

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. **Journal of Applied Physiology**, 96: 2249-2256, 2004.

ZINNA, E.M.; YARASHESKI, K.E. Exercise treatment to counteract protein wasting of chronic diseases. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**. 6(1):87-93, 2003.