

JAISSON BORDIGNON

**TREINAMENTO ANAERÓBIO/AERÓBIO ASSOCIADO À
SUPLEMENTAÇÃO DA DIETA COM ÓLEO DE FÍGADO DE
TUBARÃO DIMINUI O CRESCIMENTO TUMORAL, ATENUA A
INSTALAÇÃO DA SÍNDROME DA CAQUEXIA E MODULA
PARÂMETROS IMUNITÁRIOS DE RATOS PORTADORES DO
TUMOR DE WALKER-256**

**CURITIBA
2009**

JAISSON BORDIGNON

**TREINAMENTO ANAERÓBIO/AERÓBIO ASSOCIADO À
SUPLEMENTAÇÃO DA DIETA COM ÓLEO DE FÍGADO DE
TUBARÃO DIMINUI O CRESCIMENTO TUMORAL, ATENUA A
INSTALAÇÃO DA SÍNDROME DA CAQUEXIA E MODULA
PARÂMETROS IMUNITÁRIOS DE RATOS PORTADORES DO
TUMOR DE WALKER-256**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, área de concentração Fisiologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná como requisito para obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Cláudio Fernandes.

**CURITIBA
2009**

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Luiz Cláudio, pela oportunidade em realizar este trabalho, orientação e respeito sempre presente ao longo desta caminhada.

Aos meus pais (Pedro e Belmira) pelo incentivo aos estudos e educação. O amor e apoio de vocês sempre estiveram comigo, apesar da dificuldade imposta pela distância. Aos meus irmãos pela eterna cobrança depositada no caçula.

A minha amada esposa Mônica, pessoa presente há muitos anos em minha vida e que sem seu apoio jamais teria conseguido. Este título é dedicado a você em especial. Obrigado pelo amor e compreensão! TE AMO! Ao nosso filhinho que ainda aos 4 meses de vida intra-uterina, me deu força para terminar. Aos familiares da Mônica pelo apoio e incentivo.

Agradeço ao casal de primos e compadres (Ana Luiza e Juliano Bordignon), pela hospedagem e incentivo durante o mestrado.

Aos amigos do Laboratório de Metabolismo Celular: Marcelo (galo véio) pela parceria, amizade e ajuda em todos os momentos dessa caminhada. Nós sabemos a importância do nosso companheirismo para obtenção desse pequeno êxito. Crescemos enquanto seres humanos. És um grande amigo!

Aos amigos do laboratório: Andressa, Carina, Daniele Pequito, Isabela, Luciana e Paulo pela ajuda indispensável nos ensaios. Devo muito a vocês!

Everson, Gleisson, Pedro, Fabíola, Ricardo e Sandro por sanar minhas dúvidas e em particular pela humildade sempre demonstrada. Carine pelos ensinamentos iniciais na prática laboratorial. Ao Luiz Alexandre pela amizade e demonstração de confiança no Gurizão aqui. Valeu amigo! Ao Dalton, obrigado por sua alegria e disposição em servir que contagia o laboratório. Agradeço ao Ricelli, Juliano e Gina (colegas da nova guarda) pela ajuda e companheirismo.

Aos estagiários que aliviaram nosso fardo, tanto nos treinos dos animais quanto nas tarefas entediadas do laboratório (Juliana, Tatiana, Carolina, Bruna e Eloise).

Obrigado a todos por fazerem parte dessa fase tão importante da minha vida!

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. JUSTIFICATIVA	33
3. OBJETIVOS	34
4. MATERIAIS E MÉTODOS	35
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	45
6. RESULTADOS	46
7. DISCUSSÃO	63
8. CONCLUSÃO	74
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	-	Análise de Variância
APC	-	Célula apresentadora de antígeno
APP	-	Proteína de fase aguda
ATP	-	Adenosina trifosfato
BCAA	-	Aminoácido de cadeia ramificada
BSA	-	Albumina bovina sérica
Con A	-	Concanavalina A
CRH	-	Hormônio liberador de corticotropina
DMSO	-	Dimetil sulfóxido
DNA	-	Ácido Desoxirribonucleico
DO	-	Densidade ótica
EPM	-	Erro padrão da media
EX	-	Grupo treinado
EXA	-	Grupo treinado e suplementado
EXW	-	Grupo treinado e portador do tumor
EXWA	-	Grupo treinado, portador do tumor e suplementado
GABA	-	Ácido gama amino butírico
IFN- γ	-	Interferon gama
IgA	-	Imunoglobulina A
IGF -1	-	Fator de crescimento parecido com a insulina
IGFBP-1	-	Proteína ligante ao IGF-1
IL-1	-	Interleucina um
IL-4	-	Interleucina três
IL-6	-	Interleucina quatro
IL-10	-	Interleucina seis
IL-12	-	Interleucina dez
IL-13	-	Interleucina dez
IL-18	-	Interleucina dez
IKK	-	Quinase da proteína IKB
IKB	-	Proteína inibitória do NF-KB

HSC	- Células tronco hematopoiéticas
HSL	- Lipase hormônio sensível
LDh	- Lactato desidrogenase
LMF	- Fator de mobilização lipídica
LPL	- Lipase lipoprotéica
INF	- Interferon γ
MyoD	- Interferon γ
MIF	- Fator inibidor de migração de macrófagos
NAD ⁺	- Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo
NADH	- Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-forma reduzida.
NBT	- Nitroblue Tetrazolium.
NF-kB	- Fator de transscrição nuclear kappa B
NO	- Óxido nítrico
NK	- Células natural killer
PBS	- Tampão Fosfato-salina
PIF	- Fator indutor de proteólise
PKC	- Proteína quinase C
PMA	- Éster de Forbol Miristato Acetato
PTH	- Hormônio da paratireóide
Rpm	- Rotação por minuto
S	- Grupo sedentário
SA	- Grupo sedentário e suplementado
SW	- Grupo sedentário portador do tumor
SWA	- Grupo sedentário portador do tumor e suplementado
SOD	- Superóxido dismutase
TAGs	- Triacilglicerois
TCA	- Ácido tricloroacético
TEA	- Tampão trietanolamina
TGF- β	- Fator de transformação de crescimento β
TNF- α	- Fator de Necrose Tumoral Alfa
VLDL	- Lipoproteína de densidade muito baixa
VO ₂ max	- Consumo máximo de oxigênio

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

TABELAS

TABELA 1	Peso dos indivíduos antes e 15 dias após a inoculação do tumor, peso dos tumores ao final de 15 dias e ganho de peso no mesmo período	48
----------	---	----

FIGURAS

FIGURA 1	Foto ilustrativa de um rato caquético	14
FIGURA 2	Citocinas pró-inflamatórias podem causar perda muscular direta ou indiretamente, via anorexia e geração de proteínas de fase aguda (APP). Adaptado de SKIPWORTH et al., 2007	20
FIGURA 3	Desenho esquemático da origem das células do sistema imune a partir de células-tronco. Adaptado RUBIN et al., 2006	25
FIGURA 4	Estrutura química das moléculas de alquilglicerol mais comuns	29
FIGURA 5	Massa dos tumores (g)	46
FIGURA 6	Conteúdo de glicogênio hepático ($\mu\text{mol/g}$)	49
FIGURA 7	Conteúdo de glicogênio muscular ($\mu\text{mol/g}$)	50
FIGURA 8	Glicemia (mg/dL)	52
FIGURA 9	Lactatemia (mmol/L)	53
FIGURA 10	Triacilglicerolemia (mg/dL)	54
FIGURA 11	Capacidade Fagocítica dos Macrófagos	55
FIGURA 12	Volume Lisossomal dos Macrófagos	56
FIGURA 13	Produção de ânion superóxido pelos Macrófagos	57
FIGURA 14	Produção de Peróxido de Hidrogênio pelos Macrófagos	58
FIGURA 15	Proliferação linfocitária dos linfonodos	60
FIGURA 16	Proliferação linfocitária do timo	62
FIGURA 17	O ônus inflamatório na população idosa	70
FIGURA 18	Relação entre intensidade do exercício e susceptibilidade a infecções virais	72

RESUMO

Câncer é um estado patológico que leva ao desenvolvimento de uma síndrome metabólica em cerca de 2/3 dos pacientes em estado avançado da doença. A caquexia se caracteriza por estado debilitante, com perda de peso, desencadeada por perturbações metabólicas no indivíduo portador de tumor. Esta promove anorexia, astenia, perda de peso, saciedade prematura, anemia e alterações no metabolismo dos carboidratos, gorduras e proteínas. Muitos estudos têm demonstrado que o exercício físico moderado promove incremento da função do sistema imunitário e redução do quadro de proteólise no músculo esquelético em indivíduos caquéticos. Ainda, os estudos envolvendo óleo de fígado de tubarão demonstram sua atuação na melhoria da atividade imunitária. Uma vez que o exercício físico e o óleo de fígado de tubarão atuam sobre o desenvolvimento tumoral, o objetivo deste estudo foi investigar o efeito do treinamento anaeróbio/aeróbio associado à suplementação da dieta com óleo de fígado de tubarão sobre o crescimento tumoral, caquexia e parâmetros imunitários de ratos portadores do tumor walker-256. Ratos Wistar foram distribuídos em oito grupos: sedentário (S), sedentário suplementado com óleo de fígado de tubarão (SA), exercitado (EX), exercitado suplementado com óleo de fígado de tubarão (EXA) sedentário portador de tumor (SW), sedentário portador de tumor suplementado com óleo de fígado de tubarão (SWA), exercitado portador de tumor (EXW) e exercitado portador de tumor suplementado com óleo de fígado de tubarão (EXWA). Os grupos exercitados realizaram um programa de treinamento, constituído de 6 séries de saltos com 1 minuto de intervalo, sobrecarga de 50% do seu peso corporal acoplada ao tórax, cinco minutos após o término do treinamento de saltos os mesmos grupos exercitados foram submetidos a 30 minutos de natação com uma carga equivalente a 6% do peso corpóreo. Foram realizadas 4 sessões semanais de treinamento durante 8 semanas. Na sexta semana de treinamento foram inoculadas 1 mL de células do tumor de Walker-256 (3×10^7 células) nos grupos SW, SWA, EXW e EXWA. Os ratos foram ortotanasiados 15 dias após a inoculação do tumor, sendo coletado sangue, tecidos e células. O grupo SW apresentou hipoglicemia ($68,67 \pm 2,12$ mg/dL), hiperlaticidemia ($1,489 \pm 0,061$ mmol/L), hipertriacilglicerolemia ($161,4 \pm 9,43$ mg/dL) e perda de peso ($23,01 \pm 1,47$ g), ainda reduziu significativamente o conteúdo de glicogênio hepático e muscular, quando comparado aos demais grupos, caracterizando quadro de caquexia. A atividade fagocítica e citotóxica dos macrófagos estavam significativamente elevadas em ratos portadores de tumor. A prática de exercício e a suplementação com óleo de fígado de tubarão incrementou as capacidades fagocíticas e citotóxicas de macrófagos peritoneais, em indivíduos não portadores de tumor. Além disso, a suplementação com óleo de fígado de tubarão e o exercício físico, isoladamente, elevaram a proliferação basal dos linfócitos e a estimulação pelo mitógeno concanavalina-A promoveu aumento expressivo na proliferação, tanto nos animais sem tumor quanto nos com tumor.

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

ABSTRACT

Cancer is a pathological condition that leads to the development of metabolic syndrome in about 2/3 of patients in advanced disease. The cachexia is characterized by debilitating condition, with weight loss, metabolic disturbances triggered by the individual with tumor. This promotes anorexia, asthenia, weight loss, early satiety, anemia and changes in metabolism of carbohydrates, fats and proteins. Many studies have shown that moderate physical exercise promotes increased function of the immune system and reduction of part of the skeletal muscle proteolysis in cachectic individuals. Still, the studies of shark liver oil demonstrate its performance in improving the immune activity. Since exercise and shark liver oil act on the tumor development, the objective of this study was to investigate the effect of training anaerobic / aerobic associated with the dietary supplementation with shark liver oil on tumor growth, cachexia and parameters immune from rats carrying the Walker-256 tumor. Wistar rats were randomized divided into 8 groups: sedentary (S), sedentary shark liver oil supplemented (SA), Exercised (EX), Exercised shark liver oil supplemented (EXA), sedentary tumor-bearing (SW), sedentary tumor-bearing shark liver oil supplemented (SWA), exercised tumor-bearing (EXW) and exercised tumor-bearing shark liver oil supplemented (EXWA). Training session consisted of 6 bouts, 30 seconds each with 50% body-weight load attached to the back followed by 1 minute of resting. Five minutes after the jump training the same exercise groups were subjected to 30 minute of swimming with a load equivalente to 6% of body weight, during 4 times a week during 8 weeks. A suspension of Walker 256 tumor cells (1mL of 3×10^7 cells/mL) was inject in the rats (tumor bearing) after 6 weeks of training. All individuals were killed 15 days post tumor inoculation and the blood and tumor tissue were harvested. The group SW showed hypoglycemia ($68,67 \pm 2,12$ mg/dL), hyperlactidemia ($1,49 \pm 0,061$ mmol/L), hypertriacylglycerolemia ($161,4 \pm 9,4$ mg/dL) and weight reduction ($23,01 \pm 1,47$ g), also significantly reduced the glycogen content of liver and muscle when compared to other groups, characterizing cachexia state. The cytotoxic and phagocytic activity of macrophages were significantly elevated in tumor-bearing rats. The practice of exercise and supplementation with shark liver oil increased the phagocytic and cytotoxic capacity of peritoneal macrophages in non-tumor-bearing rats. Moreover, supplementation with shark liver oil and exercise alone, increased basal proliferation of lymphocytes and stimulation by mitogen Concanavalin-A stimulated significant increase in proliferation, in tumor-bearing and non-tumor-bearing rats.

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

1. INTRODUÇÃO

1.1 ATIVIDADE FÍSICA

O corpo humano evoluiu para um complexo organismo capaz de realizar uma enorme variedade de tarefas. A capacidade dos músculos esqueléticos gerarem força é influenciada por diversos fatores, muitos dos quais interagem em uma ação combinada. O treinamento induz ao incremento de força por alterar o recrutamento neuromuscular e morfologia das fibras musculares (AAGAARD, 2004).

O termo atividade física é definido como “qualquer prática corporal na qual o nível de solicitação muscular supera os níveis de repouso” (WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO, 2006). Com base nas formas de ação esportiva, surge, portanto a necessidade de se definir exercício e treinamento.

Na ciência do esporte, exercício é o processo de aquisição de habilidades motoras por meio de repetição, em condições variadas, com propósito de automatizar e melhorar variáveis do condicionamento físico. Já o treinamento se conceitua como a repetição sistemática e objetiva trabalho muscular com sobrecarga, acarretando em adaptações funcionais e morfológicas, visando à melhora do desempenho (HOLLMANN; HETTINGER, 2005; WEINECK, 2005).

A prática de atividades físicas regulares tem sido indicada para a imensa maioria da população humana, em virtude dos amplos benefícios oriundos de sua prática. As evidências correntes para os benefícios da atividade física vão além da saúde cardiovascular e músculo-esquelética. Investigações têm mostrado associações da atividade física na redução da mortalidade, por prevenção de doença cardiovascular, diabetes, obesidade, osteoporose e tipos específicos de câncer (FOGEHOLM; KUKKONEN-HARJULA, 2000; BAUMAN, 2004; KETELHUT et al., 2004). Booth & Lees (2007) relatam que a inatividade física está associada também com doença de Parkinson e Alzheimer.

Para adultos é recomendada a realização de atividades físicas, de moderada a grande intensidade, por pelo menos 30 minutos, na maioria dos dias da semana. Embora este volume e intensidade sejam eficazes na prevenção das

doenças cardiovasculares, parecem insuficientes para muitos indivíduos prevenirem o ganho de peso (SARIS et al., 2003). Uma melhor eficácia na prevenção de retomada de ganho de peso em indivíduos previamente obesos requer atividades de intensidade moderada entre 60 a 90 minutos diários. Ainda que sem evidências conclusivas, estabeleceu-se que atividades moderadas entre 45 a 60 minutos por dia parecem prevenir a transição de sobrepeso à obesidade (SARIS et al., 2003). A prevalência da obesidade tem estabelecido um fator de risco epidemiológico para o surgimento de muitos cânceres, sendo particularmente alarmante quando acomete crianças por incrementar mais anos ao risco de desenvolver doenças, como câncer. A modulação do balanço energético por acréscimo de atividade física tem sido demonstrada em muitos recentes estudos. Os efeitos e mecanismos de ação da atividade física sobre o processo carcinogênico, ainda não foram esclarecidos (ROGERS et al., 2008). Entretanto, fica clara a necessidade de manter o balanço energético e uma massa corporal adequada, desde os momentos mais tenros da vida, promovendo um estilo de vida ativo (SARIS et al., 2003).

Além da prevenção, a prática de atividade física regular proporciona muitos benefícios já relatados na literatura, entre eles, a saúde cardiovascular; hipotensão pós-exercício; menor resistência à insulina; maior auto-estima; alterações no padrão de força e saúde músculo-esquelética; diminuição dos problemas posturais; benefícios estéticos; diminuição do risco de morte e tratamento complementar de vários distúrbios humanos (NAHAS, 2001).

Especificamente em relação às adaptações cardiovasculares, o treinamento físico promove bradicardia em repouso e diminuição da frequência cardíaca em exercícios submáximos. Fenômeno explicado, em parte, pelo decréscimo de receptores miocárdicos β -adrenérgicos levando a diminuição da atividade simpatomimética (KIZAKI et al., 2008).

1.2 CÂNCER

O termo neoplasia (do grego, *neo*, novo + *plasma*, coisa formada) refere-se ao crescimento autônomo de tecidos que escaparam das restrições normais da proliferação celular e exibem graus variáveis de fidelidade aos seus precursores. Com base em suas propriedades de ocupar espaços, as neoplasias sólidas são denominadas tumores. Os tumores que permanecem localizados são considerados benignos, enquanto os que se disseminam para locais distantes são denominados malignos ou câncer. Este é um termo abrangente para designar crescimento celular descontrolado (RUBIN et al., 2006). Segundo Hanahan & Weinberg (2000), câncer é uma desordem hiperproliferativa que envolve transformação na morfologia celular, desregulação da apoptose, proliferação descontrolada, invasão, angiogênese e metástase.

No Brasil, as estimativas para o ano de 2008 e válidas também para o ano de 2009, apontam que ocorrerão 466.730 casos novos de câncer, segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA). Os tipos mais incidentes, à exceção do câncer de pele não melanoma, são os de próstata e pulmão no gênero masculino e os cânceres de mama e de colo do útero no gênero feminino, acompanhando o mesmo perfil da magnitude observada no mundo (INCA, 2008). Tal patologia origina-se de eventos que transformam uma célula saudável em uma tumoral, a qual se prolifera de modo descontrolado, podendo culminar ou não com a morte do portador (FERNANDES, 1995). As células cancerosas apresentam duas propriedades distintas: reproduzem-se desobedecendo aos limites normais da divisão celular e possuem a capacidade de invasão a tecidos vizinhos, colonizando-os (ALBERTS et al., 2004).

A carcinogênese parece apresentar relação com alterações na seqüência de DNA oriundas basicamente de três classes de agentes: carcinógenos químicos (promovem mudanças na seqüência de nucleotídeos); radiação ionizante (quebras ou translocações cromossômicas) e vírus (introdução de DNA exógeno). Entretanto, uma única mutação não é suficiente para causar o desenvolvimento do câncer. Estima-se que ocorram milhares de mutações durante a vida de um ser

humano. Uma das razões que evita alterações maiores são os mecanismos de reparo do DNA, presentes em nossas células, caso contrário não apresentaríamos viabilidade enquanto seres vivos. Na realidade, o que ocorre na maioria dos tipos de câncer é o acúmulo lento de muitas mutações aleatórias em determinada linhagem celular. A cada estágio posterior da divisão celular, as células com pequenas alterações podem adquirir mutações que lhes confirmam vantagens seletivas frente às vizinhas, tornando-as mais aptas a se proliferar e sobreviver. Caso ocorram mais mutações vantajosas, a descendência das células mutadas que melhor se adaptarem tomará conta do tumor e prosperará no organismo (DUNLOP; CAMPBELL, 2000; RUBIN et al., 2006).

Alem disso, estudos clínicos e epidemiológicos têm sugerido forte associação entre infecção crônica, inflamação e câncer. Como exemplo há a associação entre abuso do consumo de álcool e inflamação do fígado e pâncreas, bem como o desenvolvimento de câncer nestes órgãos. A associação entre consumo de tabaco induzindo inflamação nos pulmões e câncer, infecção com *Helicobacter Pylori* e sua associação com câncer gástrico (DOBROVOLSKAIA; KOZLOV, 2005). Desta maneira, observações sugerem que inflamação crônica está envolvida na iniciação tumoral, etapa onde há alteração genética das células normais, embora ainda sem capacidade maligna; promoção tumoral, onde pequenos agrupamentos de células com capacidade maligna são estimuladas a crescer e a etapa da progressão, na qual o crescimento tumoral se torna mais agressivo (DE VISSER et al., 2006).

1.3 CAQUEXIA

Os pacientes com câncer podem apresentar uma síndrome denominada caquexia (Figura 1), cujo desenvolvimento proporciona impacto negativo ao paciente com câncer (TISDALE, 2004). Esta síndrome afeta entre 20 a 70 % dos pacientes portadores de tumor sólido. Tal variação existe devido à distribuição desigual entre os diferentes tipos de tumor (TISDALE, 1997; ARGILÉS et al., 1999; TISDALE, 2005). A caquexia se caracteriza por estado debilitante, com

perda de peso, desencadeada por perturbações metabólicas no indivíduo portador de tumor. Esta promove anorexia, astenia, perda de peso, saciedade prematura, anemia e alterações no metabolismo dos carboidratos, gorduras e proteínas. Embora, as causas principais se limitem à anorexia e os efeitos catabólicos promovidos pelo tumor (TISDALE, 2005).

A perda de peso envolve basicamente o tecido adiposo e muscular estriado esquelético (FEARON; PRESTON, 1990; KAMOSHIDA et al., 2006), sendo conseqüência da síndrome a morte de cerca de 22 % dos pacientes com câncer (ARGILÉS et al., 2005). A taxa de síntese protéica em indivíduos saudáveis aproxima-se da casa dos 53 %, enquanto que em indivíduos caquéticos é diminuída a cerca de 8 % (TISDALE, 2000; VISSERS et al., 2007).



FIGURA 1. Foto ilustrativa de um rato em estado caquético.

Observa-se, na síndrome da caquexia induzida pelo tumor, intenso catabolismo protéico dos músculos esqueléticos, os quais representam praticamente 50 % da massa corporal do indivíduo (TISDALE, 1997).

A ingestão alimentar promove diminuição da degradação das proteínas musculares, evitando desequilíbrio de nitrogênio e depleção muscular. Porém em indivíduos caquéticos, esse mecanismo de conservação de nitrogênio está ausente, produzindo balanço negativo de nitrogênio, cujos fatores responsáveis não são completamente conhecidos (ARGILÉS et al., 1997).

A perda acentuada de gordura corporal é característica típica da caquexia. O aumento da lipólise resulta em liberação de glicerol e ácidos graxos que podem ser oxidados promovendo energia para o organismo. Tais mudanças decorrem basicamente devido a queda na atividade da lipase lipoprotéica (LPL) e aumento na atividade da lipase hormônio sensível (HSL). Associado a isso, ocorre inibição do transporte de glicose para os tecidos e da capacidade de sintetizar ácidos graxos, devido à atividade diminuída da importante enzima acetil-Coa carboxilase (ARGILÉS et al., 2005). A diminuição da atividade da lipase lipoproteica (LPL) acarreta em hipertriacilglicerolemia e compromete a absorção de lipídeos pelo tecido adiposo e muscular (NOGUCHI et al., 1996). Portanto, o intenso quadro catabólico que se instala no indivíduo portador de tumor, debilitando-o e reduzindo suas perspectivas de recuperação, não é causado apenas por má nutrição, mas também pelas alterações no metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídeos que ocorrem devido ao aumento da demanda energética gerada pela presença do tumor. Isto é necessário e conseguido pela ativação do mecanismo hepático compensatório (gliconeogênese) para manutenção plasmática de substratos energéticos para o hospedeiro, os quais são parcialmente captados pelo tecido tumoral. Participação também importante no desenvolvimento deste quadro é a hipoinsulinemia, aumento da concentração de citocinas e dos hormônios contrarreguladores: cortisol, glucagon e catecolaminas (PINTO JÚNIOR et al., 2004; ARGILÉS et al., 1997; FERNANDES et al., 1990; FERNANDES et al., 1991). Assim, o combate aos efeitos danosos da caquexia induzida pelo tumor requer terapia alternativa, as quais objetivam antagonizar essas alterações metabólicas (TISDALE, 1997).

A inflamação é comum e peculiar aos indivíduos caquéticos. Isto vem sendo demonstrado em estudos em modelos animais e humanos. A presença de estado inflamatório crônico traz consigo aberrações, incluindo alterações no eixo hipotálamo-hipófise causando perda de autonomia, hipermetabolismo, estresse oxidativo, decréscimo na síntese de proteínas musculares e incremento na proteólise muscular via ubiquitina-proteossoma, além de outras alterações metabólicas como a resistência à insulina (BARACOS, 2006). A presença da

inflamação crônica traz consigo respostas orgânicas mediadas por citocinas pró-inflamatórias como: TNF- α (fator de necrose tumoral α), IFN- γ (interferon γ), IL-1 (interleucina 1) e IL-6 (interleucina 6), além de promover estresse neuroendócrino. Outros mediadores potentes da caquexia incluem deficiências de fatores anabólicos, como a testosterona e IGF-1 (fator de crescimento semelhante à insulina - 1) e um excesso de fatores catabólicos, miostatina e glicocorticóides (MORLEY et al., 2006).

1.4 ANOREXIA

Anorexia é definida como perda severa de apetite, diminuição das sensações gustativas e saciedade prematura. Frequentemente acompanha a caquexia e tem papel de destaque na perda de peso corporal do paciente. Na anorexia, o decréscimo na ingestão alimentar é normalmente associado com diminuição do dispêndio energético, enquanto que na caquexia o gasto de energia é frequentemente aumentado. Contudo, a perda de peso e o hipermetabolismo promovido pelo tumor não são compensados por incremento espontâneo de alimento, sugerindo distúrbio nos controles hormonais orexígenos (TISDALE, 2005; BARACOS, 2006). A regulação da fome é resultante do equilíbrio da síntese de fatores orexígenos e anorexígenos, envolvendo sinais metabólicos periféricos para o cérebro, como leptina, insulina, peptídeo YY, grelina, citocinas e mediadores lipídicos (BARACOS, 2006).

Todos estes sintomas reunidos caracterizam o estado de anorexia, que por sua vez reduz a ingestão de nutrientes pelos pacientes com câncer, freqüentemente (MORLEY, 2001; TISDALE, 2001).

1.5 TURNOVER PROTÉICO

O organismo não é dotado de um sistema de armazenamento do excesso de proteínas provenientes da dieta, qualquer aminoácido ingerido além da sua necessidade imediata é oxidado ou perdido na urina. A maioria das proteínas é sintetizada e degradada em altas taxas, sendo importante na reparação de tecidos lesados. Sendo assim, a meia-vida de algumas proteínas é curta, enzimas hepáticas possui meia-vida menor que uma hora. Tal fato se mostra importante na medida em que permite rápida adequação em resposta a ingestão alimentar e ao jejum. Obviamente, há proteínas muito mais estáveis perdurando por dias e semanas. A degradação das proteínas em seus aminoácidos correspondentes é obra de enzimas hidrolíticas oriundas dos lisossomos. Ao passo que o *turnover* protéico é o próprio equilíbrio entre síntese e degradação, influenciado por alguns hormônios como insulina, hormônio do crescimento e cortisol (MAUGHAN et al., 2000).

Em condições especiais, como em pacientes portador de tumor, é notório a presença da atrofia muscular. Este desgaste muscular é caracterizado por queda na síntese de proteínas e incremento na degradação de proteínas miofibrilares. Sendo a via proteolítica ubiquitina-proteossoma a principal responsável pelo incremento da degradação protéica (RUSSEL et al., 2007).

Dentre os fatores envolvidos com a degradação muscular destaca-se o fator indutor de proteólise (PIF). Esta proteína é constitutivamente expressa em pacientes caquéticos e que apresentam grande degradação de proteína muscular. O PIF age sobre a proteína inibitória (I κ B) do fator de transcrição nuclear (NF- κ B), uma vez livre de sua proteína inibitória, o NF- κ B segue para o núcleo onde regula a transcrição de genes, dentre eles alguns componentes da via ubiquitina-proteossoma (GORDON et al., 2005).

Além disso, NF- κ B livre inibe a síntese protéica através da inibição do fator de transcrição MyoD, responsável pelo aumento da síntese. Estes dados são suportados por estudo com animais transgênicos, onde a ativação do NF- κ B resultou em aceleração da depleção da musculatura esquelética, devido à

expressão aumentada de mRNA para subunidades do proteossoma C2 e C9 (RUSSEL et al., 2007). Adicionalmente, a degradação muscular pela via ubiquitina-proteossoma é induzida também pelo fator de necrose tumoral (TNF- α), angiotensina II (Ang II) e espécies reativas de oxigênio (EROs), embora todas estejam envolvidas com a ativação de NF-kB.

1.6 CITOCINAS

A produção inicial de citocinas em resposta a um estímulo determina primeiramente, o desenvolvimento de uma resposta imunológica e subseqüentemente, se esta resposta é citotóxica, humoral, mediada por células ou alérgica (BORISH; STEINKE, 2003; PACKARD; KHAN, 2003). Citocinas são proteínas de baixo peso molecular podendo atuar de forma autócrina ou parácrina (ALI et al., 1997; BREEN, 2002). Ao ativar seu(s) receptor(es), as citocinas estimulam vias de sinalização celular que normalmente resultam em nova expressão gênica, levando a proliferação e/ou diferenciação celular (BREEN, 2002). Os receptores para citocinas geralmente apresentam-se como monômeros que possuem um domínio tirosina quinase inativo em seu segmento citoplasmático. Após a ligação da citocina, ocorre uma dimerização do receptor que resulta na justaposição de seus segmentos citoplasmáticos, permitindo a ativação dos domínios tirosina quinase com proteínas intracelulares. Embora numerosas cascatas bioquímicas estejam envolvidas na sinalização das citocinas, a principal se refere à fosforilação da tirosina quinase denominada Janus kinases (Jaks) e a ativação de fatores de transcrição, STATs (*Signal transducers and activators of transcription*) (MOORE et al., 2001; GADINA et al., 2001; KOTENKO, 2002; FICKENSCHER et al., 2002, BORISH; STEINKE, 2003).

As citocinas podem ter ações pró e antiinflamatórias. As citocinas pró-inflamatórias podem ser representadas principalmente pela interleucina (IL) –1 (IL-1), IL-2, IL-12, IL-18, fator de necrose tumoral (TNF) e interferon- γ (IFN- γ). Os principais produtores das citocinas pró-inflamatórias são os linfócitos T auxiliares (Th) CD4+, subtipo Th1, e monócitos/macrófagos (OPAL, S. M.; DePALO, V. A.,

2000). As citocinas antiinflamatórias são capazes de inibir a produção das citocinas pró-inflamatórias (HART et al., 1989; FIORENTINO et al., 1991; CASSATELLA et al., 1993; CALLARD et al., 1996). Estas incluem a IL-4, IL-6, IL-10, IL-13, o fator de transformação de crescimento β (TGF- β) e o antagonista de receptores IL-1, o IL-1ra. Elas são produzidas especialmente por linfócitos T CD4+ do subtipo Th2, mas também por monócitos/macrófagos, mastócitos, entre outros (OPAL; DePALO, 2000).

As linhagens de células cancerosas humanas expressam uma variedade de citocinas pró-inflamatórias capazes de induzir o fígado a produzir proteínas de fase aguda (APP, ver figura 2). Contudo, *in vivo*, citocinas produzidas pelas células tumorais atuam possivelmente apenas de forma local a fim de promover inflamação e ativando células inflamatórias localizadas próximas ao tumor (SKIPWORTH et al., 2007). Estas ativam outras células para iniciar uma cascata de citocinas que induzem a ativação de APP. Estudos *in vitro* sugerem que a indução do APP é realizada principalmente por mecanismo dependente de interleucina 6 (IL-6), embora outras moléculas tais como fator de necrose tumoral (TNF); IL-2; IL-8; interferon γ (IFN γ), hormônio da paratireóide (PTH) e fator inibidor da migração de macrófagos (MIF) possam desempenhar papéis importantes. Por outro lado, outras citocinas como a IL-4, IL-10 e IL-13, tem exibido atividade anti-inflamatória, podendo portanto representar potente repressão à caquexia. Além disso, é atribuída a IL-15 humana efeito anabólico sobre músculos esqueléticos de ratos através da inibição direta da proteólise muscular (SKIPWORTH et al., 2007).

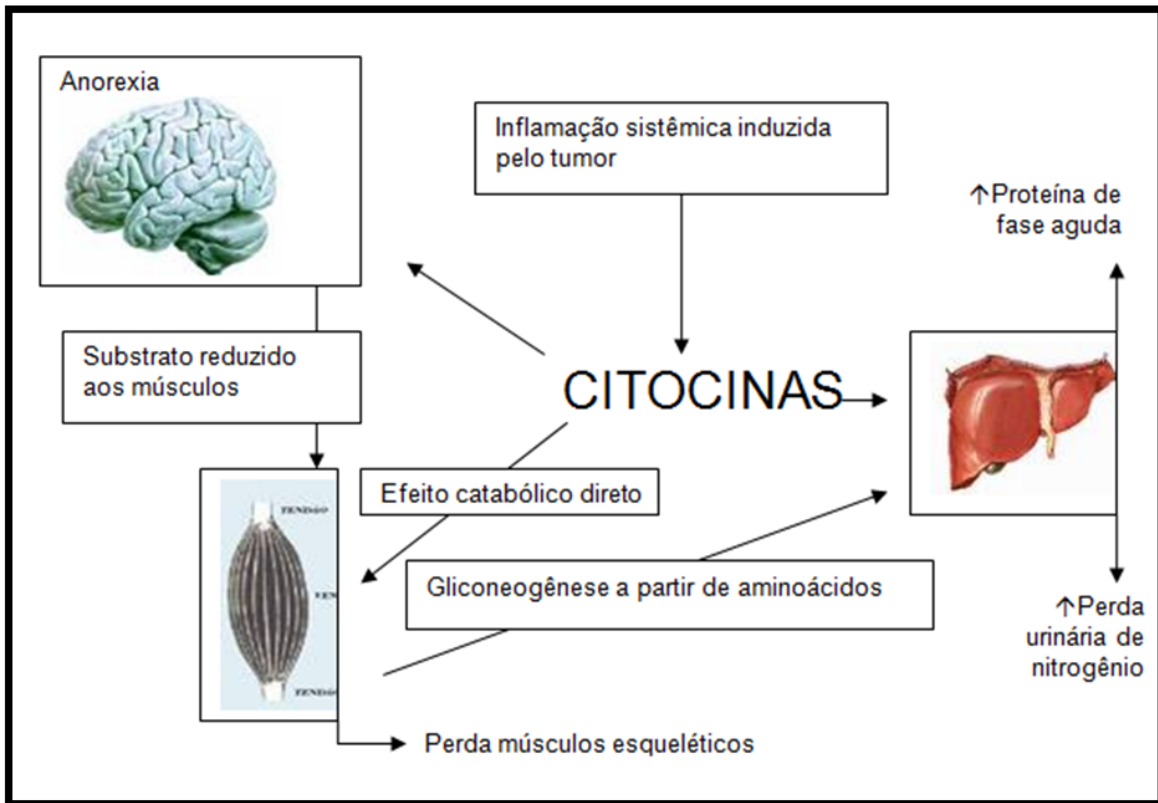


FIGURA 2. Citocinas pró-inflamatórias podem causar perda muscular direta ou indiretamente, via anorexia e geração de proteínas de fase aguda (APP) (adaptado da revisão feita por SKIPWORTH et al., 2007).

1.7 CÂNCER E ATIVIDADE FÍSICA

A atividade física tem sido consistentemente identificada como elemento central na reabilitação para muitas doenças crônicas, proporcionando melhoria na qualidade de vida e reduzindo a mortalidade em caso de doenças (MCNEELY et al., 2006). O sobrepeso e a obesidade têm sido associados a certos tipos de câncer, especialmente o de cólon, de mama em mulheres pós-menopausa, do endométrio e do esôfago. Segundo o *World Cancer Research Found* e *The American Institute of Cancer Research*, dos EUA, dietas contendo quantidade substancial e variada de vegetais e frutas podem prevenir até 20 % dos casos de câncer. O mecanismo preciso pelo qual dietas ou substâncias, particularmente, são capazes de prevenir o câncer ainda não foi elucidado completamente. Sendo

o câncer uma doença de desenvolvimento prolongado e estando intimamente relacionada à alimentação inadequada, estabelecer hábitos alimentares saudáveis na infância é de suma importância para o desenvolvimento de uma vida adulta livre da doença (RIBOLI; NORAT, 2003).

Vários grupos de pesquisadores têm investigado os efeitos potenciais do exercício na terapia anticâncer. Entre 2005 e 2006 várias análises sistemáticas foram publicadas mostrando evidências entre exercício e portadores de câncer em adultos. Pesquisas avaliaram a função do exercício em portadores de câncer sobreviventes após a conclusão do principal tratamento. A maioria destes estudos foram realizados em portadores de câncer de mama, coloretal, linfoma não-Hodgkin, entre outros. Todos os estudos examinaram os efeitos de exercícios de resistência ou exercícios mistos (resistência combinado com treinos de resistência progressiva). Os programas foram prescritos de moderada a alta intensidade (50–75 % capacidade de exercício), pelo menos 3 dias por semana, entre 10 a 60 minutos de treinamento. Os programas de treinamento foram de 2 a 15 semanas. As conclusões destas pesquisas foram variadas e incluíram condicionamento cardiorrespiratório, aumento da força, qualidade de vida, diminuição da dor, melhora do sistema imunológico e amenização da depressão (JONES; DEMARK-WAHNEFRIED, 2006)

Outra análise sistemática relatou as conseqüências do exercício sobre mulheres portadoras de câncer de mama sobreviventes e concluiu que tal intervenção é efetiva para a qualidade de vida, melhorando a capacidade cardiorrespiratória, função física e fadiga (MCNEELY et al., 2006).

Existem muitos dados publicados enfocando a relação entre atividade física e o risco de desenvolvimento de câncer. Em geral, os resultados das pesquisas epidemiológicas com seres humanos apontaram para uma clara diminuição do risco de desenvolver câncer de cólon, cerca de 30 a 40 %, em ambos os sexos, quando comparados as pessoas inativas. Em relação ao câncer de mama, há evidências de que mulheres ativas têm cerca de 20 a 30 % diminuição de risco, quando comparadas às inativas. Estes resultados dependem de 30-60 minutos por dia de atividade física moderada a intensa. No que tange o papel da atividade

física na prevenção do câncer de próstata, os dados são inconsistentes (LEE, 2003). Os levantamentos globais atribuem ao excesso de peso e estilo de vida sedentário, cerca de 25 % dos casos de câncer (McTIERNAN, 2008).

Estudos em modelos animais tem sido frequentemente contraditórios e inconclusivos. De modo geral, têm-se mostrado que o treinamento antes, mas não após o desenvolvimento do tumor, reduz metástase em roedores (SAÉZ et al., 2006).

Indivíduos cancerosos sobreviventes são clinicamente heterogêneos em termos de perfil demográfico (idade e distribuição sexual), perfil comportamental (fumante, consumo de álcool e obesidade), doenças fisiopatológicas, protocolos de tratamento e efeitos colaterais (MCNEELY et al., 2006). Esta heterogeneidade dos pacientes e da doença traz como consequência dúvidas quanto aos efeitos do exercício nestes grupos.

A taxa de síntese protéica no tecido muscular esquelético está diminuída em indivíduos com câncer (TISDALE, 2001). Logo, intervenções que venham a auxiliar na diminuição da perda de tecido muscular, como atividade física são de grande valia. O exercício é capaz de aumentar a síntese de proteínas musculares.

Embora muitos fármacos, com efeito anabolizante sobre a musculatura esquelética, produzam efeitos colaterais que podem ameaçar a fragilizada saúde do indivíduo com câncer, as terapias utilizando medicamentos que estimulam a hipertrofia muscular apresentam alguns bons resultados (STALLION et al., 1993). Estudos demonstraram efeitos potenciais da administração de fármacos como naproxeno, insulina e clenbuterol na redução do crescimento tumoral e na melhora da caquexia (PIFFAR et al., 2003). Além disso, a suplementação crônica com óleo de peixe diminui o crescimento tumoral e recupera parcialmente a síndrome da caquexia (CALDER, 1998c). Estes efeitos benéficos do óleo de peixe foram potencializados com a associação do naproxeno, clenbuterol e insulina (PINTO JÚNIOR et al., 2004). Desta forma, muitos são os esforços para se encontrar terapias que possam retardar a perda de tecido muscular esquelético.

1.8 CARACTERÍSTICAS GERAIS DO SISTEMA IMUNITÁRIO

O sistema imunitário é o principal mecanismo que protege o hospedeiro contra a invasão de agentes estranhos. As células e moléculas responsáveis pela imunidade formam o sistema imunológico e a sua resposta a introdução de substâncias estranhas é a resposta imunológica. Uma resposta imunológica pode ser provocada por ampla gama de agentes, incluindo parasitas, bactérias, vírus, substâncias químicas, toxinas e drogas (ABBAS; LICHTMAN, 2005; RUBIN et al., 2006).

As células que constituem o sistema imunitário são denominadas, genericamente de leucócitos. Estes podem ser divididos em granulócitos que englobam os neutrófilos, basófilos e eosinófilos e agranulócitos, representados por monócitos/macrófagos e linfócitos. Fisiologicamente, o sistema imunológico está dividido em sistema inato e adaptativo. A comunicação entre o sistema inato e o adaptativo pode ocorrer pelo contato direto célula-célula e/ou pela liberação de mensageiros químicos. Os componentes celulares do sistema imunológico derivam-se de células tronco hematopoiéticas (HSC) pluripotentes. Perto do final do primeiro mês de embriogênese, as células HSC surgem nas ilhas eritropoiéticas extra-embriônicas adjacentes ao saco vitelínico. Com seis semanas, o sítio primário de hematopoese se desvia das ilhas sanguíneas extra-embriônicas para o fígado fetal e depois para a medula óssea. As HSC pluripotentes se diferenciam em células-tronco linfóides e mielóides. No caso de células-tronco mielóides, em unidades formadoras de colônias linhagens-específicas (UFC). Sob influência de microambiente adequado, as UFCs originam tipos celulares maduros. As células-tronco linfóides são precursoras de células *natural killer* (NK), linfócitos T e B, estes últimos originam plasmócitos (Figura 3). (JANEWAY et al., 2000; CALDER, 2001; HOLLMANN; HETTINGER, 2005; RUBIN et al., 2006).

O sistema imunitário utiliza as citocinas para modular a resposta imunitária (REID, 2001). Desse modo, a produção e liberação devem possuir um controle adequado, com participação de outras citocinas e uma via complexa de *feedback*

no anseio de manter a homeostase, haja vista que a expressão descontrolada de citocinas pode ocorrer em células que passaram por processos de transformação tornando-se malignas (DUNLOP; CAMPBELL, 2000). Uma citocina atuante nas respostas inflamatórias é o fator de necrose tumoral (TNF). Altas concentrações de TNF no plasma estão associadas com demência e arteriosclerose em idosos. O TNF exerce seus efeitos através de dois receptores de superfície celular, o receptor de TNF (TNFr) I e II, que estão presentes em vários tipos celulares, incluindo os linfócitos T. Em humanos idosos, a elevação de TNF induz a apoptose de células T e está associada com aumento na expressão de TNFr do tipo I e decréscimo TNFr do tipo II (BRUUNSGAARD et al., 2000).

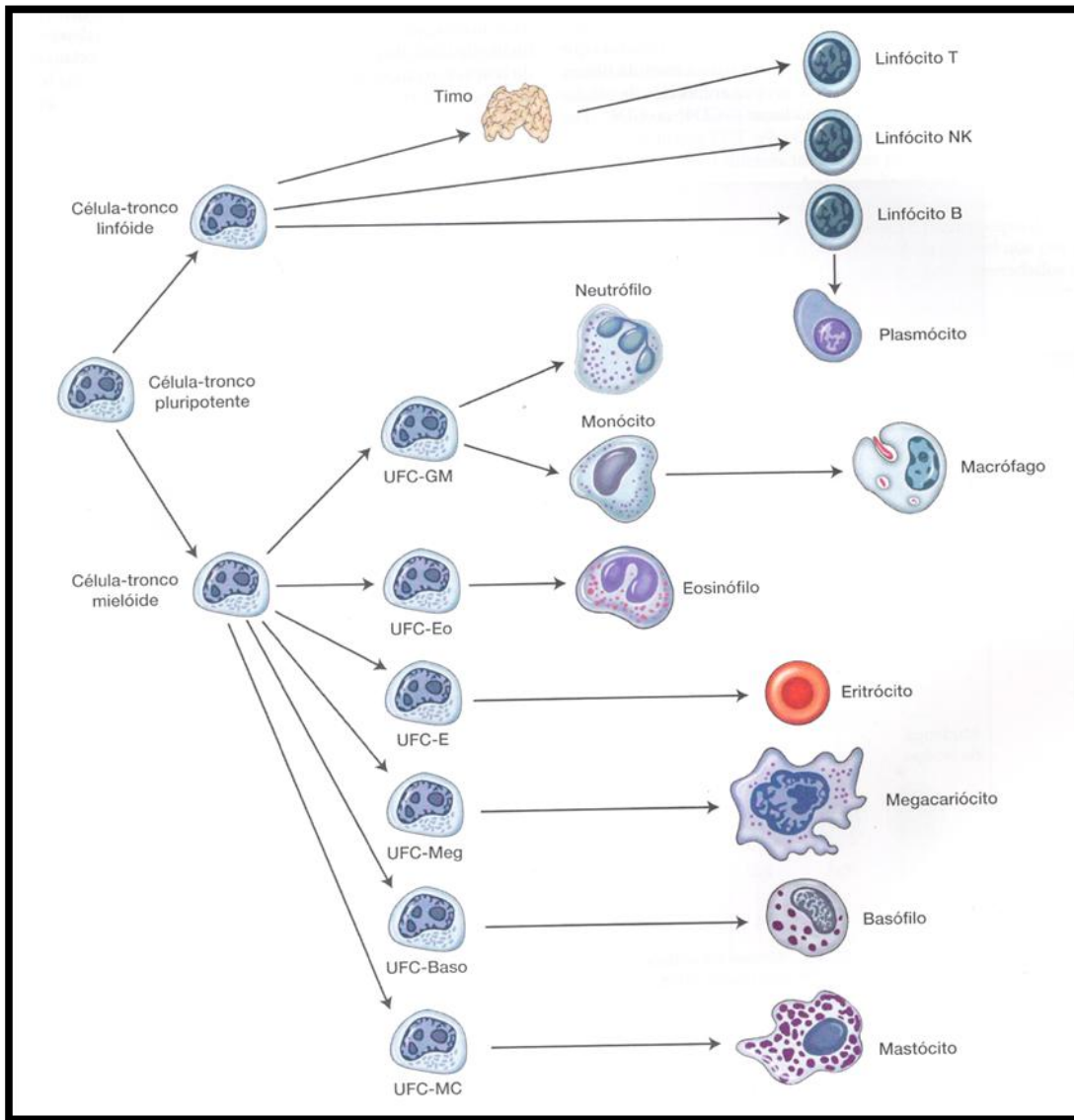


FIGURA 3. Desenho esquemático da origem das células do sistema imune a partir de células-tronco (RUBIN et al., 2006).

1.8.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS NEUTRÓFILOS

Os neutrófilos são produzidos na medula óssea e representam a população mais numerosa dos leucócitos circulantes. Esta célula de defesa inata medeia as fases iniciais na resposta à inflamação. Os neutrófilos circulam por cerca de 6 horas e caso não sejam recrutados a um sítio infeccioso são fagocitados por macrófagos residentes no fígado e baço. Junto com os macrófagos, os neutrófilos possuem a capacidade de ingerir e digerir vários microorganismos e partículas

antigênicas, por um processo denominado fagocitose. Os neutrófilos podem também ser chamados de leucócitos polimorfonucleares e constituem um grupo de células com núcleos multilobulados, contendo grânulos citoplasmáticos preenchidos com elementos químicos como enzimas e de espécies reativas de oxigênio (EROs). As EROs foram identificadas como causas de lesão celular em diversas doenças, incluindo o câncer. Existem três tipos principais: ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH) (ABBAS; LICHTMAN, 2005; JANEWAY et al., 2000).

1.8.2 CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS MACRÓFAGOS

Os macrófagos e monócitos (precursor circulante do macrófago) desempenham funções importantes na imunidade inata e adaptativa, sendo efetivos na eliminação de microrganismos. Este tipo celular está extensamente distribuído pelo corpo, mostrando grande variedade estrutural e funcional. Macrófagos são mediadores celulares importantes da defesa inata e a primeira linha de defesa contra microrganismos invasores por produzir várias citocinas e mediadores antimicrobianos (KIZAKI et al., 2008).

Já foi demonstrado que o treinamento moderado em esteira induziu aumento na produção de óxido nítrico (NO) e citocinas essenciais para a defesa antimicrobiana em linhagens de macrófagos de camundongos, sugerindo a redução do risco de infecção (KIZAKI et al., 2008). Além disso, povoam estrategicamente tecidos próximos a locais por onde invasores podem adentrar no hospedeiro. A função primária dos macrófagos é identificar, ingerir e destruir microrganismos. Após ser recrutado, este leucócito permanece por mais tempo nos locais de inflamação, podendo inclusive sofrer divisão celular no próprio local. Os macrófagos também possuem a habilidade de apresentar antígenos a outras células, sendo, portanto denominado de *célula apresentadora de antígeno* (APC – *antigen presenting cells*). Em adição, estas células secretam citocinas que possuem funções na imunidade inata e adaptativa (JANEWAY et al., 2000; ABBAS; LICHTMAN, 2005; RUBIN et al., 2006).

1.8.3 CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS LINFÓCITOS

Os linfócitos são células capazes de reconhecer antígenos de modo distinto, sendo responsáveis pela especificidade e memória que são as características mais marcantes da resposta imunológica adquirida. Existem três tipos principais de linfócitos: células T, B e NK que somam 25 % dos leucócitos do sangue periférico. Cerca de 80 % dos linfócitos circulantes são células T, 10 % células B e 10 % células NK. Os linfócitos T apresentam-se como os mediadores da imunidade celular. Originam-se de células precursoras da medula óssea e completam seu desenvolvimento no timo. Este tipo celular consiste em dois tipos, linfócitos T auxiliares e linfócitos T citotóxicos. Os linfócitos B produzem os anticorpos e são originários de progenitores da medula óssea, completando seu desenvolvimento no mesmo tecido (ABBAS; LICHTMAN, 2005; RUBIN et al., 2006).

1.9 SISTEMA IMUNITÁRIO E ATIVIDADE FÍSICA

Já está bem definido que o exercício físico, enquanto modelo mensurável de indução de estresse, provoca alterações funcionais no sistema imunológico (KEAST et al., 1988; PEDERSEN et al., 1994). Diferentes tipos e cargas de exercício físico podem provocar alterações distintas nos parâmetros imunológicos (KEAST et al., 1988). Alguns estudos demonstraram que quando realizado em intensidade moderada (<60% do $VO_{2máx}$) parece estar relacionado ao aumento da resposta dos mecanismos de defesa orgânica (CANNON, 1993; NIEMAN, 1990b; NIEMAN, 2000). Porém, quando os exercícios são intensos e prolongados (>65% do $VO_{2máx}$) ou o treino é excessivo, parecem enfraquecê-la (CANNON, 1993; NIEMAN, 1990a).

Pedersen & Hoffman-Goetz (2000), sugerem que os exercícios físicos intensos ou prolongados podem causar decréscimo progressivo nas funções de

neutrófilos, na capacidade proliferativa dos linfócitos e nas concentrações de imunoglobulinas na saliva e no soro.

Durante o trabalho físico ocorre aumento no número de leucócitos no sangue em resposta ao aumento das citocinas oriundas dos danos musculares. Após solicitações de resistência aeróbia de longa duração, vê-se diminuição do número de linfócitos no sangue, redução das funções das células NK e B, caracterizando um momento de favorecimento à infecções. Deste modo, compreende-se a observação clínica de que esportistas de alto rendimento apresentam aumento de risco à infecções, ao passo que os indivíduos que praticam esporte para manter a saúde possuem proteção imunológica maior (PEDERSEN; BRUUNSGAARD, 1995). Entretanto, os mesmos autores relatam que a imunodepressão observada é apenas evidente quando o exercício físico é intenso e de longa duração acima de sessenta minutos.

1.10 ÓLEO DE FÍGADO DE TUBARÃO

Do conteúdo lipídico presente nas células hepáticas de diferentes espécies de tubarão, cerca de 30-50 % corresponde ao éter lipídico denominado alquilglicerol. Estas moléculas se caracterizam por serem gorduras constituídas por uma cadeia hidrocarbônica, saturada ou insaturada, unida por ligação do tipo éter a uma das hidroxilas do glicerol (BROHULT et al., 1977).

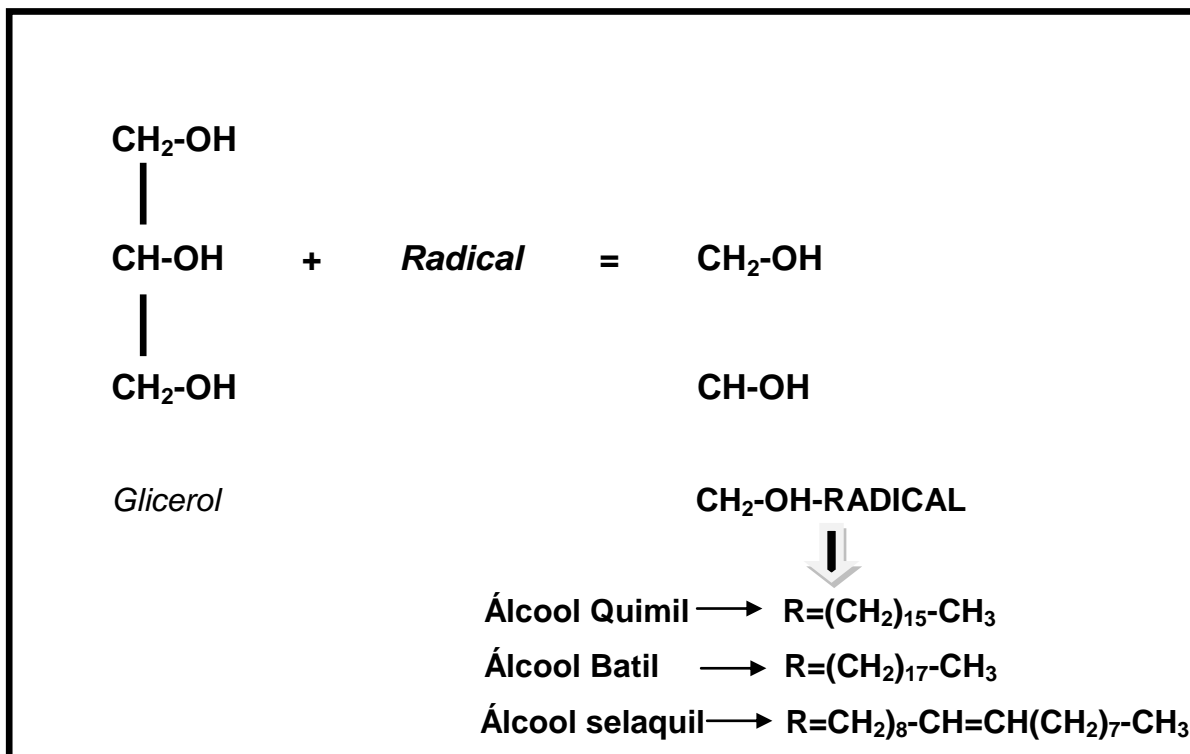


FIGURA 4: Estrutura química das moléculas de alquilglicerol mais comuns.

Os alquilgliceróis são éteres lipídicos presentes em órgãos hematopoiéticos e particularmente abundante em óleo de fígado de tubarão. Éteres lipídicos são substâncias químicas com pronunciada atividades biológicas, tais como efeito anti-tumoral; modulação hematopoiética; estimulação do sistema imunológico; atividade antibiótica contra várias bactérias, fungos e parasitas (LE BLANC et al., 1995; PÉDRONO et al., 2007). Os alquilgliceróis, também estão presentes na medula óssea humana, no leite materno e no leite de vaca. Em fontes naturais, os alquilgliceróis são encontrados sob a forma esterificada, ou seja, ligada a ácidos graxos principalmente poliinsaturados unidos por ligações éster às duas hidroxilas livres do glicerol sendo assim denominados de alquildiacilgliceróis (BROHULT, 1962).

Esqualeno, precursor esteróide do colesterol, e esqualamina, esteróide aminado (PIETRAS et al., 2005), são outras moléculas de interesse biológico encontradas no óleo de fígado de tubarão. A esqualamina em particular, apresenta baixo peso molecular e dentre seus efeitos, destaca-se seu caráter como inibidor de angiogênese (WILLIAMS et al., 2001).

O mecanismo de ação antiproliferativo dos éteres lipídios no tumor não foi ainda estabelecido. Tais lipídios afetam as células tumorais por se inserirem na bicamada lipídica da membrana, afetando o sistema de transporte celular. Com isso induzem apoptose, interferindo em enzimas chave, como a proteína quinase C (PKC), competindo pelo sítio de ativação dessa enzima, além de promover a formação de citocinas (CONESA-ZAMORA et al., 2004).

1.10.2 MECANISMOS DE IMUNOLOGIA TUMORAL

O sistema imunitário tem três papéis primários na prevenção de tumores. Primeiramente, o sistema imunitário pode proteger o hospedeiro dos tumores induzidos por vírus, através da eliminação ou supressão da infecção viral. Secundariamente, a oportuna eliminação de patógenos e a rápida resolução do processo inflamatório, o que previne o estabelecimento de um quadro inflamatório crônico que é propício ao desenvolvimento tumoral. O terceiro papel do sistema imunitário na prevenção de tumores é sua capacidade de identificar e eliminar antígenos específicos das células transformadas ou moléculas produzidas por células sob “estresse”. Embora atualmente se saiba que poucos antígenos são exclusivos do tumor, diminuindo a eficácia do sistema de defesa (SWANN; SMYTH, 2007).

Conceitualmente, as células tumorais precisam burlar três fases de monitoramento do sistema imunitário designadas de fase eliminatória, de equilíbrio e de escape. A primeira fase se caracteriza pela eliminação das células transformadas por ação da imunidade inata e adaptativa, oferecendo proteção ao organismo e impedindo o desenvolvimento de um tumor. A fase de equilíbrio ocorre quando uma célula transformada deixa de ser vista como estranha ao organismo. E finalmente, as células resistentes a destruição mediada pelo sistema imunitário se proliferarão induzindo a inflamação crônica e com chance de colonizar outros órgãos, definindo a fase de escape tumoral (DUNN et al., 2004).

Dados da literatura, corroborados em modelos animais de cânceres humanos estabeleceram que a inflamação promovida no ambiente tumoral se torna um componente crítico na promoção e progressão tumoral. O ambiente inflamatório é ocupado por células residentes e macrófagos recrutados, células dendríticas, células T e células *Natural Killers* (NK). Consciente da associação existente entre inflamação crônica e desenvolvimento tumoral, nota-se que a infiltração celular pode exercer, preferivelmente, efeitos paradoxais durante o desenvolvimento tumoral (DE VISSER et al., 2006). Mais dados deram suporte à noção de que o infiltrado leucocitário no tumor, desencadeado pela inflamação aguda, não exerce os mecanismos imunoprotetores normais que precedem a evolução do câncer. No microambiente tumoral há um delicado equilíbrio entre imunidade antitumoral e iniciação tumoral (BEN-BARUCH, 2006). Estas atividades dependem de diferentes mediadores lançados por células inflamatórias, células cancerosas ou tipos celulares associados ao tumor, como células endoteliais e fibroblastos do hospedeiro. Quando a ativação dos mediadores antitumorais é bloqueada, as células tumorais sofrem escape e crescimento rápido. Em contraste, quando a mediação antitumoral é suficientemente forte a ponto de superar a imunossupressão mediada pelo tumor, as células transformadas são eliminadas (HADDE, 2003).

O elo molecular entre inflamação, iniciação e progressão tumoral é estabelecido por um fator de transcrição nuclear chamado NF- κ B. Esta proteína regula a expressão de muitos genes, cujos produtos podem suprimir a apoptose, estimular o ciclo celular em células tumorais, aumentar a transição epitelial mesenquimal, o qual tem papel importante na invasividade tumoral (KARIN, 2006).

1.11 EXERCÍCIO FÍSICO E ESTRESSE OXIDATIVO

No decurso das duas últimas décadas tem-se tentado demonstrar que o exercício pode incrementar a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), em tecidos biológicos como músculos esqueléticos e cardíacos. Vários relatos corroboram que o exercício gera estresse oxidativo sempre quando são

exaustivos (CABRERA-GOMEZ et al., 2006). Estresse oxidativo envolve aumento na formação de ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (HO), dentre outros, genericamente denominados de espécies reativas de oxigênio (EROs), em detrimento das defesas antioxidantes químicas e enzimáticas disponíveis. As EROs são átomos, íons ou moléculas que contêm oxigênio com um elétron não pareado em sua órbita externa. São caracterizadas por grande instabilidade e por isso elevada reatividade (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). Estudos em modelos animais e em humanos têm demonstrado que o aumento da atividade metabólica celular, promovida pelo treinamento físico, favorece lesões oxidativas em biomoléculas. A prática de exercícios físicos predominantemente aeróbios provoca aumento do fluxo de oxigênio na mitocôndria, sendo que uma fração diminuta deste oxigênio, cerca de 5 % não é completamente reduzido, formando assim EROs (AOI et al., 2004).

Em particular, as EROs promovem ativação de AP-1 (proteína ativadora) e NF- κ B (fator nuclear Kappa B), uma via de transdução de sinal que exerce envolvimento sobre a transcrição de genes envolvidos na regulação de vias do crescimento celular (VALKO et al., 2006).

2. JUSTIFICATIVA

Nos últimos 200 anos houve grande alteração na dieta humana e paralelamente redução do exercício físico pelas populações das grandes metrópoles. Isto tudo tem sido demonstrado impactar o desenvolvimento de doenças crônico-degenerativas, particularmente, o câncer. Assim, acreditamos que a introdução de consumo de óleo de fígado de tubarão na dieta associado a prática de exercício físico modificam a taxa de crescimento tumoral, caquexia e resposta imunitária em ratos portadores de tumor de Walker 256.

3. OBJETIVOS

Muitos estudos têm demonstrado que o exercício físico moderado promove incremento da função do sistema imunitário e redução do quadro de proteólise no músculo esquelético em indivíduos caquéticos. Ainda, os estudos envolvendo óleo de fígado de tubarão demonstram sua atuação na melhoria da atividade imunitária. Uma vez que o exercício físico e o óleo de fígado de tubarão atuam sobre o desenvolvimento tumoral, o objetivo deste estudo foi investigar o efeito do treinamento anaeróbio/aeróbio associado à suplementação da dieta com óleo de fígado de tubarão sobre o crescimento tumoral, caquexia e parâmetros imunitários de ratos portadores do tumor walker-256.

Para alcançar estes objetivos, os seguintes parâmetros foram analisados:

- Massa corpórea dos animais;
- Massa tumoral;
- Os seguintes parâmetros bioquímicos de caquexia: concentrações plasmáticas de glicose, lactato, triacilglicerol (TAG) e conteúdo de glicogênio hepático e muscular;
- A atividade citotóxica de macrófagos retratada pela produção de peróxido de hidrogênio e ânion superóxido;
- A atividade fagocítica e o volume lisossomal dos macrófagos peritoneais;
- A capacidade de adesão dos macrófagos;
- A capacidade proliferativa de linfócitos estimulados com concanavalina A (Con A) ou lipopolissacarídeo (LPS).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos machos adultos (70 dias), albinos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*, var. albinus), obtidos no biotério do Setor de Ciências Biológicas (SCB) da UFPR, Campus do Centro Politécnico, Curitiba, PR. Os animais foram submetidos a ciclo claro/escuro (22/10 horas), com temperatura controlada de $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$, com água e ração a vontade (Nuvilab®). Os experimentos foram realizados no Laboratório de Metabolismo Celular no Departamento de Fisiologia do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Todos os procedimentos utilizando animais foram submetidos à aprovação pela comissão de ética em experimentação animal (CEEA) do Setor de Ciências Biológicas, número 284, da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Os ratos foram divididos aleatoriamente, formando oito grupos: sedentário sem suplementação (S), sedentário suplementado com óleo de fígado de tubarão (SA), sedentário portador de tumor (SW), sedentário portador de tumor e suplementado com óleo de fígado de tubarão (SWA), exercitado sem suplementação (EX), exercitado portador de tumor (EXW), exercitado com suplementação (EXA) e exercitado portador de tumor suplementado com óleo de fígado de tubarão (EXWA).

4.3 PESAGEM DOS INDIVÍDUOS E DOS TUMORES

Durante todo o período de experimento, a massa corporal dos indivíduos foi mensurada aos domingos e quartas, no período da manhã, utilizando a balança

Urano (precisão 0,01g). O tumor foi pesado em balança de precisão (Denver Instrument XL-410 - precisão 0,0001g), quando ocorreu a ortotanásia.

4.4 SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE FÍGADO DE TUBARÃO

Os animais foram submetidos à suplementação crônica, durante 8 semanas com óleo de fígado de tubarão na dose de 1g/kg de massa corporal. O óleo de fígado de tubarão é uma preparação de lipídeos obtidos do fígado de tubarão (cápsulas de 250 mg da Ecomer IMUNI SHARK®). As cápsulas eram conservadas no escuro e abertas momentos antes à suplementação.

4.5 PROTOCOLO DE TREINAMENTO

A maioria dos animais terrestres, como os ratos possuem a habilidade do nado e são bons nadadores quando necessário. A natação pode ser utilizada na identificação de alterações fisiológicas, bioquímicas e respostas moleculares para exercício agudo e adaptações crônicas.

Os protocolos de natação podem proporcionar um tipo de exercício mais uniforme quando realizados de forma apropriada (AMERICAN PHYSIOLOGICAL SOCIETY, 2006).

Alguns fatores que influenciam os processos de adaptação foram considerados, dentre eles: condição de treinamento, idade, sexo, intervalos de descanso, alimentação, adaptabilidade do animal, métodos e meios do treinamento, tipos de sobrecarga e fatores climáticos (WEINECK, 2006). Após um período de adaptação ao meio líquido (uma hora de natação por dia durante dois dias consecutivos sem utilização de sobrecarga) os animais foram submetidos a 8 semanas de treinamento de saltos, seguido de meia hora de natação com quatro sessões semanais (segundas, terças, quintas e sextas-feiras), resultando em 32 sessões de treinamento. O treinamento de saltos foi constituído de 6 séries de saltos de 30 segundos, com 1 minuto de intervalo, em tanque de água e sobrecarga de 50 % de sua massa corporal (atualizada semanalmente), acoplada

ao tórax. Cinco minutos após o término do treinamento de saltos, os animais foram submetidos ao protocolo de treinamento de natação, o qual consistiu em 30 minutos de natação com uma carga equivalente a 6% da massa corpórea do animal (atualizada semanalmente), presa ao tórax. Este percentual representou esforço aeróbico no limiar do lactato (LT) e o período total de treinamento necessário para produzir adaptações requeridas é de 6 semanas (GOBATO et al., 2001). A temperatura da água foi mantida a $32\pm 2^{\circ}\text{C}$. Os saltos foram realizados em piscinas de tubo PVC com 250 mm de diâmetro, visando limitar a alternativa do animal em seguir para outra direção, favorecendo dessa forma o salto. A profundidade da água correspondeu a 150 % do comprimento corporal do rato (ROGATTO; LUCIANO, 2001, adaptado).

4.6 OBTENÇÃO E INOCULAÇÃO DAS CÉLULAS DO TUMOR DE WALKER 256

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 15 dias (FERNANDES, 1995). Nestes experimentos foram utilizados matrizes com o tumor de Walker 256, tipo B, cedido gentilmente pelo Professor Dr. Rui Curi, ICB – USP, e mantido pelo Laboratório de Metabolismo Celular da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

Para obtenção de muitas células foi injetado intraperitonealmente em um rato macho adulto, uma suspensão de 2×10^7 células/mL do tumor de Walker 256. Após um período de 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, massageou-se seu abdômen, e através de laparotomia mediana, foi coletado da cavidade abdominal, com pipeta de plástico, o fluido contendo as células tumorais. Na seqüência efetuava-se a contagem do número

de células tumorais utilizando-se câmara de Neubauer. Após a contagem, 3×10^7 células (em 1 ml de solução) foram inoculadas subcutaneamente no flanco direito nos animais em experimentação por volta da sexta semana de treinamento.

4.7 ORTOTANÁSIA DOS RATOS

Após 8 semanas de treinamento e coincidindo com o 15º dia após a implantação do tumor, realizamos a ortotanásia dos indivíduos com o auxílio de guilhotina. Este método proporciona a retirada de grande volume sangue, necessário às análises séricas e isolamento de células polimorfonucleares.

4.8 MENSURAÇÃO PLASMÁTICA 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. A leitura foi feita em espectrofotômetro ULTROSPEC 2000 (Pharmacia Biotech) a 505 nm.

4.9 DETERMINAÇÃO DOS TRIACILGLICERÓIS (TAGS)

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

4.10 MENSURAÇÃO PLASMÁTICA DO LACTATO

Foi determinado pelo método enzimático, segundo ENGLE & JONES (1978). Inicialmente fez-se a desproteíntização do soro, pela adição de 50 µL de ácido tricloroacético (TCA a 25%) a 500 µL da amostra e a mistura agitada em vórtex, centrifugada por 1 minuto a 13.000 rpm. Em seguida, foi coletado 200 µL

do sobrenadante e adicionado 2 μL de indicador universal para permitir a visualização da neutralização do soro, pela adição de KOH / TRIS (0,5 M / 2 M), sinalizada pela coloração verde, indicando pH 7,0. Em seguida, foi pipetado 100 μL do soro neutralizado em tubos de ensaio contendo 1 mL do tampão do ensaio (descrito abaixo) e, após 45 minutos, fez-se leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda 340 nm. O princípio dessa mensuração consiste na conversão do lactato a piruvato pela ação da lactato desidrogenase (LDh), ocorrendo consumo de NAD^+ 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, foi calculada a concentração do lactato sérico em $\mu\text{mol/mL}$, pela fórmula:

$$[\text{Lactato}] = \frac{\text{D. O.}}{6,22} \times \frac{V1}{V} \times \frac{V2}{V3} \times \frac{V4}{V5}$$

[Lactato] = concentração de lactato produzida

D. O. = densidade ótica

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

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

4.11 DETERMINAÇÃO DO GLICOGÊNIO HEPÁTICO E MUSCULAR

O conteúdo de glicogênio foi determinado segundo Leighton e cols. (1989) adaptado. O fígado, aproximadamente 90 mg, foi retirado e colocado em tubos de ensaio contendo 500 µL de KOH 1M e deixado em banho a 60 °C por 30 minutos, para a digestão do tecido. Após o banho, as amostras foram ao vórtex e pipetadas 100 µL em Eppendorfs contendo 17,5 µL de ácido acético glacial e 500 µL de tampão acetato contendo amiloglucosidase 0,1%, e submetidas ao banho-maria (37 °C) por 3 horas. Ao final deste período centrifugou-se as amostras por 5 minutos a 15000 G, e 100 µL de cada amostra foi colocada em novos tubos de ensaio contendo 1 mL do tampão trietanolamina (TEA) e hexokinase e glicose-6-fosfato desidrogenase. Após 40 minutos as amostras foram lidas no espectrofotômetro em um comprimento de onda de 340 nm.

4.12 CONTAGEM DAS CÉLULAS TUMORAIS E MACRÓFAGOS

A contagem total (número de células por mL) foi realizada em câmara de Neubauer utilizando-se 100 µL de suspensão de células em 100 µl de Azul de

Trypan. As células que se coraram em azul foram consideradas inviáveis, enquanto que as brilhantes e refringentes a luz, viáveis.

4.13 METODOLOGIAS PARA ENSAIOS UTILIZANDO MACRÓFAGOS

4.13.1 OBTENÇÃO DE MACRÓFAGOS

A obtenção de macrófagos peritoneais deu-se após remoção da pele da região abdominal e injeção de 20 mL de tampão fosfato-salina (PBS), pH 7,4, 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 tipo Pasteur de plástico. Em seguida, o líquido contendo as células foi centrifugado, duas vezes, a 1500 rpm, 4 °C, durante 10 minutos em centrífuga Eppendorf modelo 5810R.

4.13.2 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 consiste 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 foi preparada pela diluição de 20 µL da solução estoque em 5 ml de PBS. A solução de vermelho fenol para os ensaios de produção de H₂O₂ 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 10⁸ 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 µL de vermelho neutro.

4.13.3 CAPACIDADE DE ADESÃO DE MACRÓFAGOS

A técnica foi realizada de acordo com Rosen & Gordon (1987). Macrófagos peritoneais foram incubados por 24 horas a 37 °C e 5 % de CO₂. Em seguida as escavações foram lavadas com PBS e as células aderentes fixadas com metanol 50 %, em seguida adicionou-se o corante de Giemsa 0,1 % e após 40 minutos os poços foram lavados com PBS e o corante solubilizado com metanol 50 %. A absorvância foi mensurada a 550 nm, em leitor de microplacas (Bench Mark – Biorad).

4.13.4 ATIVIDADE FAGOCÍTICA DOS MACRÓFAGOS

O método utilizado foi o descrito por Bonatto e cols. (2004). Da solução peritoneal foi depositado 100 µL contendo 10⁵ células em cada poço, em placa de 96 perfurações e adicionou-se 10 µL de zymosan corado com vermelho neutro e incubou-se por 30 minutos. Após, adicionou-se 100 µL de fixador. Após 30 minutos, a placa foi lavada com PBS e centrifugada por 5 minutos a 1.500 rpm. O vermelho neutro que estava 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 absorvância/ 10⁵ células e os resultados corrigidos de acordo com a capacidade de adesão.

4.13.5 PRODUÇÃO DE ÂNION SUPERÓXIDO

A produção de ânion superóxido foi medida pela redução de nitroblue tetrazolium (NBT), um composto amarelo lipossolúvel que se torna insolúvel e de cor azul no seu estado reduzido (MADHAVI et al., 1994). Alíquotas de 100 µL de solução do peritônio foram colocadas em poços, como descrito anteriormente, e seguida de NBT 0,1 % e 10 µL de PMA (80 µM), onde ficaram incubando por 30 minutos a 37°C. A placa foi centrifugada por 5 minutos a 1500 rpm, lavada com PBS e as células fixadas com metanol 50 %. Após uma incubação de 10 minutos,

a placa foi centrifugada novamente e o sobrenadante descartado. O NBT reduzido, presente no sedimento, foi solubilizado em 120 μL de KOH e 140 μL dimetilsulfóxido (DMSO). A absorvância do sobrenadante foi determinada a 550 nm em leitor de microplacas (Bench Mark – Biorad). Os dados foram expressos em absorvância/ 10^5 células e os resultados corrigidos de acordo com a capacidade de adesão.

4.13.6 PRODUÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

A produção de peróxido de hidrogênio foi mensurada utilizando-se o método descrito por Bonatto e cols. (2004). Através da oxidação de vermelho fenol é possível detectar a produção de H_2O_2 . Alíquotas de 100 μL de solução do peritônio contendo 10^5 células e 10 μL de éster de forbol miristato acetato (PMA \bar{A} -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 μL da solução de vermelho fenol. Incubou-se durante 30 minutos e a leitura realizada a 620 nm em leitor de microplacas (Bench Mark –Biorad). Os dados foram expressos em $\mu\text{mol}/10^5$ células e os resultados corrigidos de acordo com a capacidade de adesão.

4.13.7 VOLUME LISOSSOMAL

Para esta análise utiliza-se o método descrito por Pipe e cols. (1995), onde em placas de 96 escavações depositou-se 100 μL da solução, contendo 10^5 células e 20 μl de solução estoque de vermelho neutro (20 mg de vermelho neutro em 1 mL de DMSO) a 2 %. Após 30 minutos, a placa foi centrifugada por 5 minutos a 1.500 rpm. O sobrenadante descartado e os orifícios lavados com PBS, para eliminar o vermelho neutro que não foi internalizado pelas células. Adicionou-se 100 μL de solução de extração para solubilizar o vermelho neutro que estava dentro dos lisossomos. Após 30 minutos, a placa foi lida a 550 nm utilizando leitor de placas (Microplate reader Bio-rad - Benchmark). Os dados foram expressos em

absorbância/ 10^5 células e os resultados corrigidos de acordo com a capacidade de adesão.

4.14 PROLIFERAÇÃO LINFOCITÁRIA

Depois de serem coletados e lavados com PBS+AB, e após centrifugação a 1200rpm/7'4°C, o sobrenadante será descartado e o precipitado foi dissolvido em 1 mL de meio de cultivo RPMI-1640 enriquecido com 10 % de soro fetal bovino e 0,1 % de antibióticos (penicilina 10.000U e estreptomicina 10mg/L). Os linfócitos foram contados e então cultivados em placas de 96 escavações, 2×10^6 células/escavação, a 37°C em atmosfera de 95% ar/ 0,5% CO₂, por 48h. Os linfócitos foram estimulados com 20μL/escavação dos mitógenos Concanavalina A (Con A-5μg/mL) por 48 horas. Após, incubados com 20μL de solução contendo (2-¹⁴C)-timidina por um período adicional de 18h, sob as mesmas condições descritas anteriormente. Após este período as células foram coletadas automaticamente em coletor múltiplo (*Skatron Combi Multiple Cell Harvester*, UK) em papéis de filtro específicos para coleta. Os discos de papéis contendo a radioatividade incorporada no DNA foram levados para contagem em cintilador Beckman LS 6500.

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os resultados estão apresentados como a média \pm E.P.M. de 4 experimentos em triplicata. Os resultados foram avaliados por análise de multivariância, levando em consideração exercício físico, suplementação da dieta e tumor, como fatores, seguida do teste de Bonferroni. O pacote estatístico utilizado foi o GraphPad Prism 5. O nível mínimo de significância em todos os casos foi fixado em $p < 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1 PARÂMETROS RELATIVOS AO TUMOR DE WALKER 256

6.1.1 MASSA DOS TUMORES

Na FIGURA 5 está apresentada a massa do tumor dos animais após 15 dias da inoculação. No grupo sedentário (SW) a massa tumoral (g) foi de $23,01 \pm 1,47$ (g). A suplementação com óleo de fígado de tubarão induziu a uma nova taxa de crescimento ($p < 0,05$ vs SW) que foi de $18,74 \pm 1,27$. Nos animais exercitados a massa tumoral foi de $17,04 \pm 1,03$, a qual foi significativamente menor quando comparado à do grupo SW ($p < 0,05$) isso não foi diferente do SWA ($p > 0,05$). A associação da suplementação com exercício físico reduziu ainda mais a massa tumoral ($14,35 \pm 1,12$), a qual foi significativamente menor quando comparado à todos os demais grupos ($p < 0,05$).

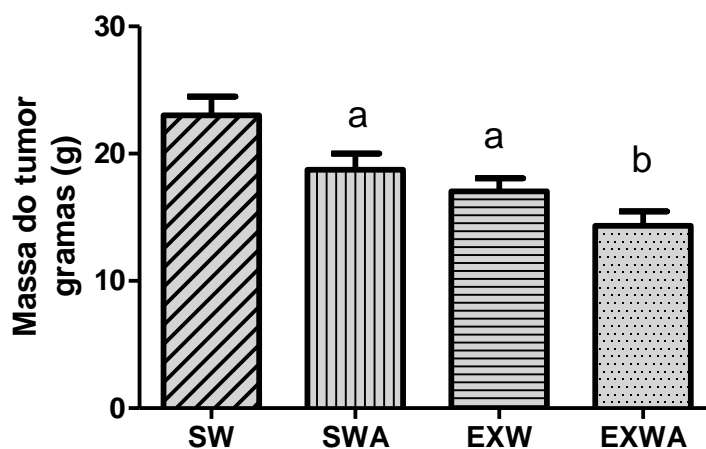


FIGURA 5. Massa dos tumores (g), relativo aos indivíduos dos grupos sedentário portador de tumor (SW); sedentário portador de tumor e suplementado com óleo de fígado de tubarão (SWA); exercitado portador de tumor (EXW); exercitado portador de tumor suplementado com óleo de fígado de tubarão (EXWA). Os dados representam a média \pm EPM de 11 animais (SW, EXW), 16 animais para o grupo SWA e 15 para o grupo EXWA. ^a $p < 0,05$ vs SW. ^b $p < 0,05$ vs SW, SWA e EXW.

6.1.2 MASSA CORPORAL DOS INDIVÍDUOS ANTERIORMENTE A INOCULAÇÃO DO TUMOR E QUINZE DIAS APÓS A INOCULAÇÃO DO TUMOR

A massa corporal dos animais sedentários ou exercitados, sem e com tumor, não foram diferente quando da inoculação das células tumorais e também ao final de 14 dias ($p>0,05$). Contudo o ganho de peso do grupo sedentário e sedentário suplementado com óleo de fígado de tubarão (SA) foi em média de 12 g, e os exercitados e exercitados suplementados com óleo de fígado de tubarão foi de 5 g, o que foi 2,4 vezes menor que às dos sedentários ($p<0,05$ vs S e SA). No grupo sedentário portador de tumor o peso da carcaça (peso final – peso tumor) reduziu de 11,4 g ($p<0,05$ vs S). A suplementação com óleo de fígado de tubarão impediu uma perda significativa de peso ($p<0,05$ vs SW), contudo ainda foi maior quando comparado à de seu equivalente sem tumor ($p<0,05$ vs SA). A prática de atividade física (EX) e sua associação com a suplementação com óleo de fígado de tubarão fizeram o mesmo que o já observado com a suplementação com óleo de fígado de tubarão isoladamente ($p<0,05$ vs EX e EXA, respectivamente).

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

TABELA 1: Peso dos indivíduos antes e 15 dias após a inoculação do tumor, peso dos tumores ao final de 15 dias e ganho de peso no mesmo período. ^ap<0,05 quando comparado ao grupo S. ^bp<0,05 quando comparado ao grupo SA. ^cp<0,05 quando comparado ao grupo SW.

6.2 CONTEÚDO DE GLICOGÊNIO HEPÁTICO

O conteúdo do glicogênio hepático ($\mu\text{mol/g}$ de tecido) nos animais sem tumor sedentário (S) ou exercitado (EX), sedentário suplementado (SA) e exercitado com suplementação (EXA), não foi diferente entre eles, sendo em média de 92. A presença do tumor reduziu cerca 1,1 vezes nos animais sedentários (SW), a qual foi significativa ($p < 0,05$) quando comparado ao seu equivalente sem tumor (S). A suplementação com óleo de fígado de tubarão (SWA), e exercício físico (EXW) impediram a redução do conteúdo do glicogênio ($p < 0,05$ vs SW), a qual foi similar ($p > 0,05$) à dos animais sem tumor (SA e EX). A associação do exercício físico com a suplementação com óleo de fígado de tubarão não modificou este cenário ($p > 0,05$ vs EXA).

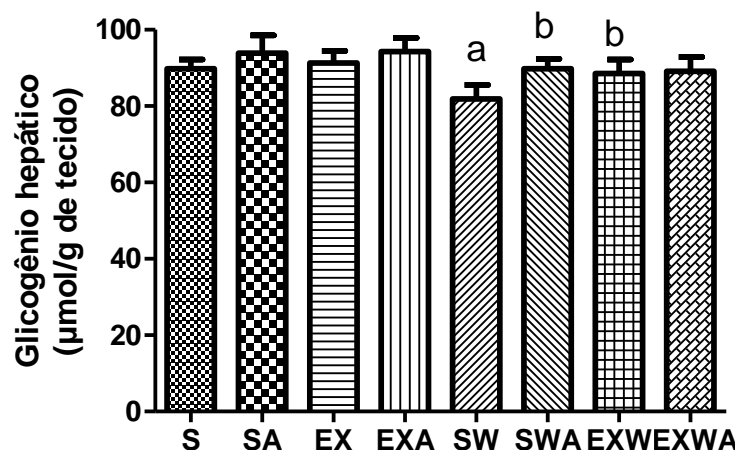


FIGURA 6. Conteúdo de glicogênio hepático ($\mu\text{mol/g}$ de tecido) dos animais dos grupos sedentário sem suplementação (S); sedentário com suplementação de óleo de fígado de tubarão (SA); exercitado sem suplementação (EX); exercitado com suplementação de óleo de fígado de tubarão (EXA); sedentário portador de tumor (SW); sedentário portador de tumor e suplementado com óleo de fígado de tubarão (SWA); exercitado portador de tumor (EXW); exercitado portador de tumor suplementado com óleo de fígado de tubarão (EXWA). Os dados estão apresentados como média \pm EPM de 6 animais para o grupo (SW), 7 animais para o grupo (EXW), 9 animais para os grupos (SA e EX), 10 animais para os grupos

(S, EX, EXWA) e 11 animais para o grupo (SWA). ^a $p < 0,05$ quando comparado ao grupo S. ^b $p < 0,05$ quando comparado ao grupo SW.

6.3 GLICOGÊNIO MUSCULAR

O conteúdo do glicogênio muscular ($\mu\text{mol/g}$ de tecido) nos animais sem tumor sedentário (S) ou exercitado (EX), sedentário suplementado (SA) e exercitado com suplementação (EXA), não foi diferente entre eles, sendo em média de 62. A presença do tumor reduziu cerca 1,2 vezes nos animais sedentários (SW), a qual foi significativa ($p < 0,05$) quando comparado ao seu equivalente sem tumor (S). A suplementação com óleo de fígado de tubarão (SWA), e exercício físico (EXW) impediram a redução do conteúdo do glicogênio ($p < 0,05$ vs SW), a qual foi similar ($p > 0,05$) à dos animais sem tumor (SA e EX). A associação do exercício físico com a suplementação com óleo de fígado de tubarão não modificou este cenário ($p > 0,05$ vs EXA).

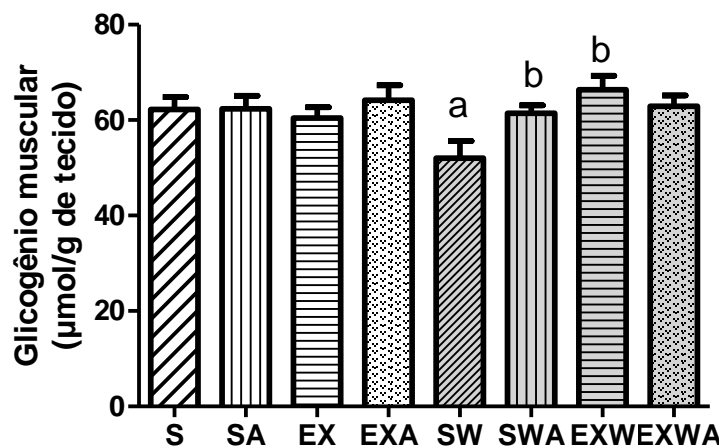


FIGURA 7. Conteúdo de glicogênio da porção branca do músculo gastrocnêmio ($\mu\text{mol/g}$ de tecido) nos animais dos grupos, sedentário sem suplementação (S); sedentário com suplementação de óleo de fígado de tubarão (SA); exercitado sem suplementação (EX); exercitado com suplementação de óleo de fígado de tubarão (EXA); sedentário portador de tumor (SW); sedentário portador de tumor e suplementado com óleo de fígado de tubarão (SWA); exercitado portador de tumor (EXW); exercitado portador de tumor suplementado com óleo de fígado de tubarão

(EXWA). Os dados estão apresentados como média \pm EPM de 8 animais para os grupos (EXA, SW, SWA e EXW), 9 animais para o grupo (EXWA) e 10 animais para os grupos (S, SA e EX). ^a $p < 0,05$ quando comparado ao grupo S. ^B $p < 0,05$ quando comparado ao grupo SW.

6.4 PARÂMETROS PLASMÁTICOS

6.4.1 GLICEMIA

Na FIGURA 8 estão apresentados os dados referentes à glicemia. Nos animais sem tumor sedentários (S), suplementados com óleo de fígado de tubarão (SA), exercitados (EX) e também suplementados (EXA), a glicemia foi em média de ± 94 mg/dL. A presença do tumor (SW) induziu a hipoglicemia, a qual foi de $68,67 \pm 2,12$ mg/dL, significativamente menor quando comparado à do grupo S ($p < 0,05$). A suplementação com óleo de fígado de tubarão reverteu parcialmente a hipoglicemia ($76,73 \pm 2,82$) mas este ainda foi menor quando comparado à do SA ($p < 0,05$). A prática de exercício físico (EXW) foi também capaz de reverter a queda da glicemia ($82,27 \pm 2,64$ mg/dL) porém este ainda foi inferior quando comparado à dos animais sedentários (S) sem tumor ($p < 0,05$). A associação da suplementação de óleo de fígado de tubarão e exercício físico (EXWA) elevaram um pouco a glicemia ($85,42 \pm 2,92$ mg/dL), mas este ainda foi significativamente menor quando comparado à de seu equivalente sem tumor ($p < 0,05$ vs EXA).

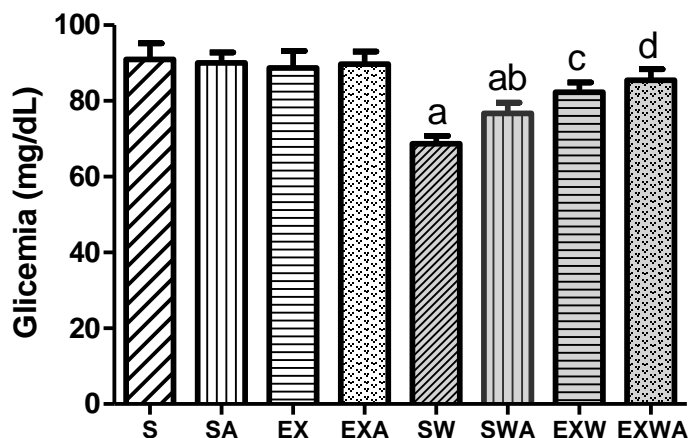


FIGURA 8. Glicemia (mg/dL) dos grupos sedentário sem suplementação (S); sedentário com suplementação de óleo de fígado de tubarão (SA); exercitado sem suplementação (EX); exercitado com suplementação de óleo de fígado de tubarão (EXA); sedentário portador de tumor (SW); sedentário portador de tumor e suplementado com óleo de fígado de tubarão (SWA); exercitado portador de tumor (EXW) e exercitado portador de tumor suplementado com óleo de fígado de tubarão (EXWA). Os dados estão apresentados como média \pm EPM de 14 animais para os grupos (S, SW, EXWA), 15 animais para o grupo (SA), 12 animais para os grupos (EX, EXA, EXW) e 15 animais para o grupo (SWA). ^a $p < 0,05$ quando comparado ao grupo S. ^b $p < 0,05$ quando comparado ao grupo SA. ^c $p < 0,05$ quando comparado ao grupo SW. ^d $p < 0,05$ quando comparado ao grupo SWA.

6.4.2 CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE LACTATO

Na FIGURA 9 está representada a concentração sérica de lactato. Não houve alteração da concentração de lactato plasmático nos animais sem tumor suplementados ou exercitados ($p > 0,05$). A presença do tumor elevou a lactatemia (mmol/L) dos grupos SW e SWA quando comparada à do grupo S e SA, respectivamente. A suplementação com óleo de fígado de tubarão no grupo sedentário (SWA), bem como o exercício (EXW) diminuíram a lactatemia quando

comparada à do grupo SW. O exercício físico associado à suplementação com óleo de fígado de tubarão (EXWA) reduziu ainda mais quando comparado à do grupo SWA ($p < 0,05$), mas não quando comparada à do grupo EXW ($p > 0,05$).

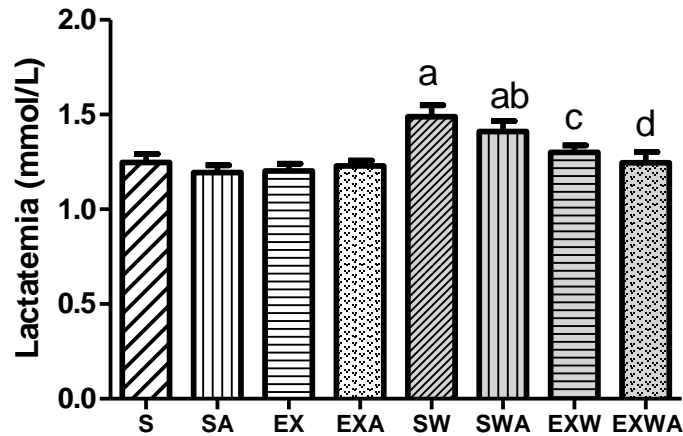


FIGURA 9. Lactatemia (mmol/L) dos grupos sedentário sem suplementação (S); sedentário com suplementação de óleo de fígado de tubarão (SA); exercitado sem suplementação (EX); exercitado com suplementação de óleo de fígado de tubarão (EXA); sedentário portador de tumor (SW); sedentário portador de tumor e suplementado com óleo de fígado de tubarão (SWA); exercitado portador de tumor (EXW) e exercitado portador de tumor suplementado com óleo de fígado de tubarão (EXWA). Os dados estão apresentados como média \pm EPM de 10 animias para os grupos (S, SA, SW, SWA, EXWA), 11 animais para o grupo (EX) e 8 animais para os grupos (EXA, EXW). ^a $p < 0,05$ quando comparado ao grupo S. ^b $p < 0,05$ quando comparado ao grupo SA. ^c $p < 0,05$ quando comparado ao grupo SW. ^d $p < 0,05$ quando comparado ao grupo SWA.

6.4.3 CONCENTRAÇÃO DE TRIACILGLICERÓIS SÉRICOS (TAGS)

A presença do tumor no grupo sedentário SW induziu a uma elevação na concentração de TAGs, sendo significativamente maior ($p < 0,05$), quando comparada aos demais grupos.

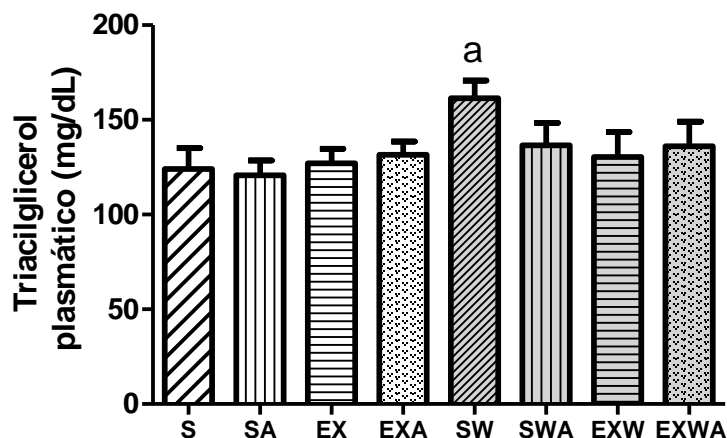


FIGURA 10. Concentração de triacilglicerol sérico (mg/dL) dos grupos sedentário sem suplementação (S); sedentário com suplementação de óleo de fígado de tubarão (SA); exercitado sem suplementação (EX); exercitado com suplementação de óleo de fígado de tubarão (EXA); sedentário portador de tumor (SW); sedentário portador de tumor e suplementado com óleo de fígado de tubarão (SWA); exercitado portador de tumor (EXW) e exercitado portador de tumor suplementado com óleo de fígado de tubarão (EXWA). Os dados estão apresentados como média \pm EPM de 13 animais para os grupos (S, SA, SW), 12 animais para os grupos (EX, EXA), 16 animais para o grupo (SWA), 11 animais para o grupo (EXW) e 14 animais para o grupo (EXWA). ^a $p < 0,05$ quando comparado aos grupos S, SA, EX, EXA, SWA, EXW, EXW, EXWA.

6.5 PARÂMETROS FUNCIONAIS DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS

Os ensaios referentes aos macrófagos peritoneais foram corrigidos pela capacidade de adesão dos mesmos e representados como percentual em relação ao grupo controle (S).

6.5.1 ATIVIDADE FAGOCÍTICA DOS MACRÓFAGOS

Todos os grupos com ou sem tumor, suplementados ou não, exercitados ou não, incrementaram em aproximadamente 40 % em comparação ao grupo sedentário sem tumor ($p < 0,05$ vs S).

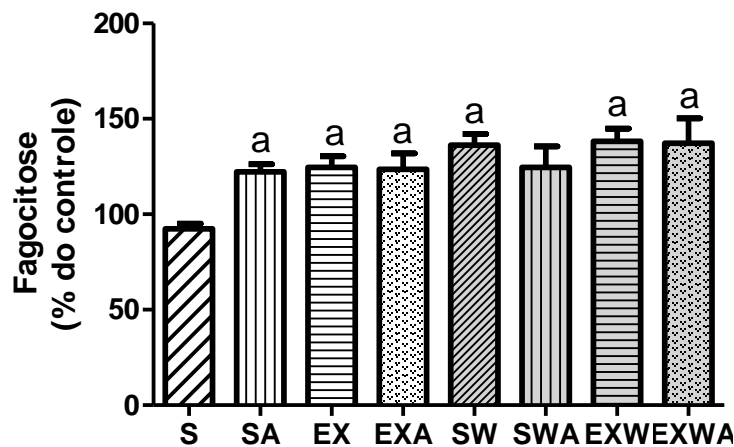


FIGURA 11. Fagocitose dos macrófagos peritoneais dos grupos sedentário sem suplementação (S); sedentário com suplementação de óleo de fígado de tubarão (SA); exercitado sem suplementação (EX); exercitado com suplementação de óleo de fígado de tubarão (EXA); sedentário portador de tumor (SW); sedentário portador de tumor e suplementado com óleo de fígado de tubarão (SWA); exercitado portador de tumor (EXW) e exercitado portador de tumor suplementado com óleo de fígado de tubarão (EXWA); Os dados estão apresentados como média \pm EPM de 5 animais por grupo de 4 experimentos, em quadruplicata. ^a $p < 0,05$ vs S.

6.5.2 VOLUME LISSOSSOMAL DOS MACRÓFAGOS

Nos animais dos diferentes grupos sem tumor (S, SA, EX e EXA) não houve alteração do volume lisossomal. A presença do tumor (SW, SWA, EXW e EXWA) elevou o volume lisossomal de maneira similar em todos os diferentes grupos, quando comparados aos animais sem tumor ($p < 0,05$).

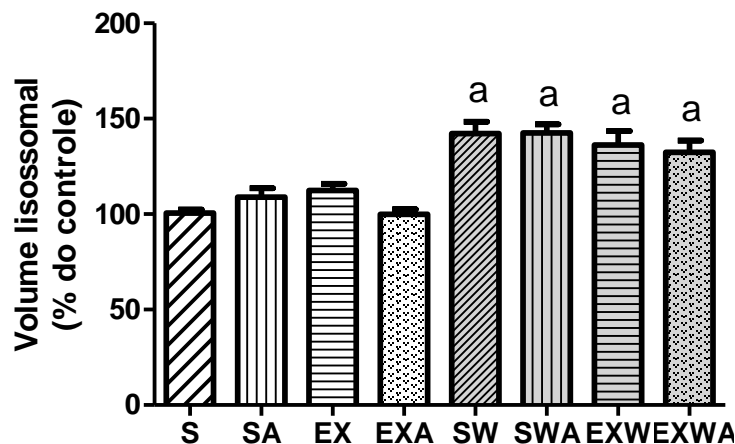


FIGURA 12. Volume Lisossomal dos Macrófagos Peritoneais dos indivíduos dos grupos sedentário sem suplementação (S); sedentário com suplementação de óleo de fígado de tubarão (SA); exercitado sem suplementação (EX); exercitado com suplementação de óleo de fígado de tubarão (EXA); sedentário portador de tumor (SW); sedentário portador de tumor e suplementado com óleo de fígado de tubarão (SWA); exercitado portador de tumor (EXW) e exercitado portador de tumor suplementado com óleo de fígado de tubarão (EXWA). Os dados estão apresentados como média \pm EPM de 5 animais por grupo de 4 experimentos, em quadruplicata. ^a $p < 0,05$ quando comparado aos grupo sem tumor.

6.5.3 PRODUÇÃO DE ÂNION SUPERÓXIDO DOS MACRÓFAGOS

A produção de ânion superóxido pelos macrófagos dos diferentes grupos está apresentado na figura 13. A suplementação com óleo de fígado de tubarão (SA) elevou a produção em 30 %, o mesmo aconteceu com os ratos exercitados (EX) a qual foi de 42 %, ambos significativamente maiores quando comparada à do grupo sedentário ($p < 0,05$ vs S). A associação da suplementação com o exercício (EXA) não provocou efeito diferente daquele já induzido isoladamente pelo exercício e suplementação ($p > 0,05$ vs SA e EX). A presença do tumor elevou a produção de ânion superóxido em cerca de 50 %, quando comparado à do grupo sedentário sem tumor ($p < 0,05$ vs S). No grupo com tumor, suplementado

com óleo de fígado de tubarão (SWA) ou submetido a exercício físico (EXW) a produção não foi diferente do grupo sedentário com tumor ($p > 0,05$ vs SW). A associação do exercício com suplementação (EXWA) não alterou o quadro, ficando similar ao das manobras isoladas ($p > 0,05$ vs SWA e EXW).

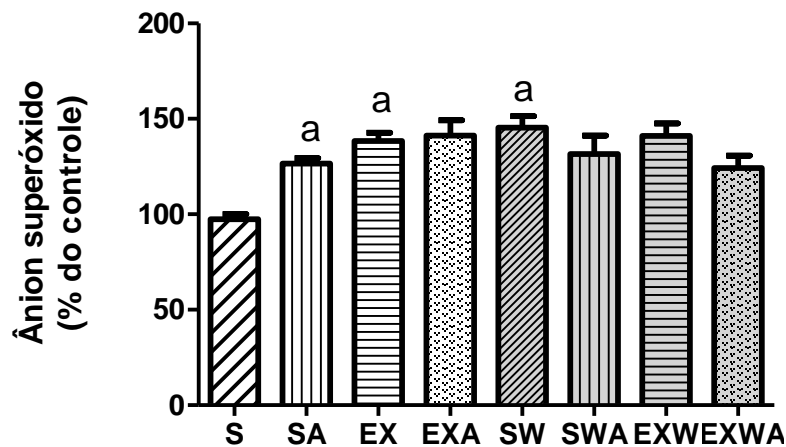


FIGURA 13. Produção de ânion superóxido pelos macrófagos dos grupos sedentários sem suplementação (S); sedentário com suplementação de óleo de fígado de tubarão (SA); exercitado sem suplementação (EX); exercitado com suplementação de óleo de fígado de tubarão (EXA); sedentário portador de tumor (SW); sedentário portador de tumor e suplementado com óleo de fígado de tubarão (SWA); exercitado portador de tumor (EXW) e exercitado portador de tumor suplementado com óleo de fígado de tubarão (EXWA). Os dados estão apresentados como média \pm EPM de 5 animais por grupo de 4 experimentos, em quadruplicata. ^a $p < 0,05$ vs S.

6.5.4 PRODUÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO DOS MACRÓFAGOS

A produção de peróxido de hidrogênio pelos macrófagos peritoneais dos diferentes grupos está apresentada na figura 14. Nos animais sem tumor, sedentários ou não, suplementados ou não, a produção de peróxido de hidrogênio entre os grupos não foi diferente ($p > 0,05$). Já com a presença do tumor (SW), esta se elevou em 1,8 vezes quando comparado à do grupo sedentário sem tumor

($p < 0,05$ vs S). A suplementação com óleo de fígado de tubarão (SWA), o exercício físico (EXW) e associação de ambos (EXWA) não induziu a alteração da produção de peróxido de hidrogênio diferente daquela observada pela presença do tumor isoladamente ($p > 0,05$ vs SW), mas foi superior à de seus equivalentes sem tumor ($p < 0,05$).

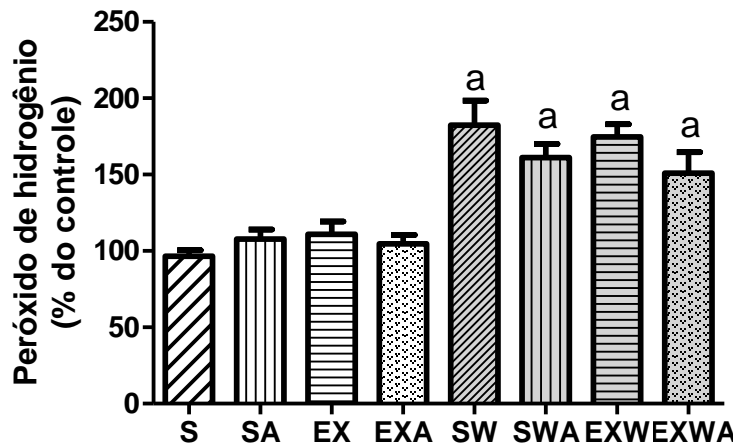


FIGURA 14. Produção de Peróxido de Hidrogênio pelos Macrófagos Peritoneais dos indivíduos dos grupos sedentários sem suplementação (S); sedentário com suplementação de óleo de fígado de tubarão (SA); exercitado sem suplementação (EX); exercitado com suplementação de óleo de fígado de tubarão (EXA); sedentário portador de tumor (SW); sedentário portador de tumor e suplementado com óleo de fígado de tubarão (SWA); exercitado portador de tumor (EXW) e exercitado portador de tumor suplementado com óleo de fígado de tubarão (EXWA). Os dados estão apresentados como média \pm EPM de 5 animais por grupo de 4 experimentos, em quadruplicata. ^a $p < 0,05$ vs os sem tumor.

6.6 PROLIFERAÇÃO LINFOCITÁRIA

6.6.1 LINFÓCITOS DO LINFONODO MESENTÉRICO

A FIGURA 15 representa a proliferação de linfócitos obtidos do linfonodo mesentérico, em contagem por minuto (cpm). Na ausência de tumor e estímulo, a

suplementação com óleo de fígado de tubarão (SA) elevou a proliferação basal linfocitária em 3,9 vezes ($p < 0,05$) quando comparada ao controle (S). O mesmo foi observado pela prática de exercício físico com elevação de 3,4 vezes ($p < 0,05$ vs. S) e a associação de ambas causou elevação de 3,6 vezes ($p < 0,05$ vs. S), ou seja, efeito similar aos dois fatores isoladamente ($p > 0,05$). Na presença do tumor e ausência de estímulo (SW), a proliferação dos linfócitos obtidos do linfonodo mesentérico foi similar ($p > 0,05$) à do grupo controle (S). A suplementação com óleo de fígado de tubarão (SWA), exercício físico (EXW) e suas associações (EXWA) não modificaram a proliferação linfocitária ($p > 0,05$) não havendo diferença estatística quando comparada à dos animais portadores de tumor (SW). Na presença do mitógeno concanavalina-A (Con-A) no grupo sem tumor, a proliferação dos linfócitos obtidos dos animais controle sem tumor (S) elevou-se em 5,9 vezes. A suplementação com óleo de fígado de tubarão (SA) não foi modificada ficando similar à ausência de Con-A ($p > 0,05$). O exercício físico sob estímulo elevou a proliferação linfocitária em 3,9 vezes ($p < 0,05$) e a associação de ambos os fatores (EXA) incrementaram também a proliferação linfocitária em 2,3 vezes, a qual não foi significativamente diferente da do grupo EX ($p > 0,05$), mas foi diferente quando comparada à do suplementado com óleo de fígado de tubarão ($p < 0,05$ vs. SA). Na presença de tumor (SW) sob estímulo com Con-A, a proliferação linfocitária elevou-se em 4,7 vezes quando comparada à ausência de estímulo ($p < 0,05$), mas não foi diferente quando comparada ao grupo sem tumor ($p > 0,05$). No grupo suplementado com óleo de fígado de tubarão portador de tumor (SWA) a proliferação elevou-se em 5,4 vezes quando comparada à proliferação basal ($p < 0,05$) e também foi diferente quando comparada à do grupo sem tumor ($p < 0,05$). O exercício físico incrementou a proliferação linfocitária em 3,9 vezes quando comparada à ausência de estímulo ($p < 0,05$), mas não foi diferente à do grupo sem tumor ($p > 0,05$). Associando suplementação com óleo de fígado de tubarão e exercício físico (EXWA) causou elevação da proliferação linfocitária em 8 vezes ($p < 0,001$), a qual foi significativamente maior que à do grupo SWA e EXW, isoladamente, e foi também 1,4 vezes maior que à do grupo sem tumor ($p < 0,05$ vs. EXA).

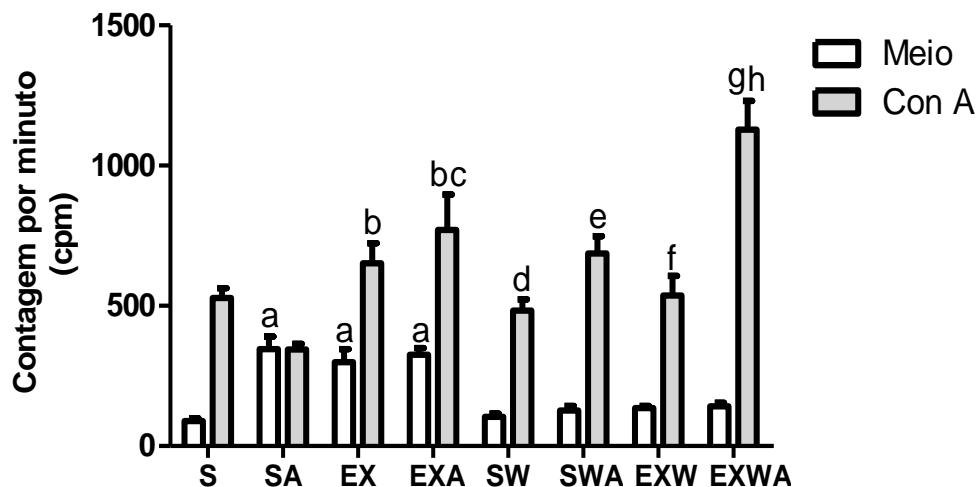


FIGURA 15. Proliferação de linfócitos do linfonodo mesentérico sem Con-A (barra branca) e estimulados com Con-A (barra cinza) (contagem por minuto) dos grupos sedentário (S); sedentário com suplementação de óleo de fígado de tubarão (SA); exercitado sem suplementação (EX); exercitado com suplementação de óleo de fígado de tubarão (EXA); sedentário portador de tumor (SW); sedentário portador de tumor e suplementado com óleo de fígado de tubarão (SWA); exercitado portador de tumor (EXW) e exercitado portador de tumor suplementado com óleo de fígado de tubarão (EXWA). Os dados estão apresentados como média \pm EPM de 22 para o grupo (S), 8 para o grupo (SA), 14 para os grupos (EX e EXA), 13 para o grupo (SW), 11 para o grupo (SWA), 19 para o grupo (EXW) e 16 para o grupo EXWA. ^a $p < 0,05$ quando comparado ao S (sem estímulo). ^b $p < 0,05$ quando comparado ao S (com estímulo). ^c $p < 0,05$ quando comparado ao AS (com estímulo). ^d $p < 0,05$ quando comparado ao SW (sem estímulo). ^e $p < 0,05$ quando comparado ao SWA (sem estímulo). ^f $p < 0,05$ quando comparado ao EXW (sem estímulo). ^g $p < 0,001$ quando comparado ao SWA e EXW (sem estímulo). ^h $p < 0,05$ quando comparado ao EXA (com estímulo).

6.6.2 LINFÓCITOS DO TIMO

A proliferação de linfócitos obtidos do timo, em situação basal, nos animais sem tumor suplementados com óleo de fígado de tubarão (SA) foi similar à do controle ($p > 0,05$ vs. S). O mesmo foi observado nos linfócitos obtidos dos animais exercitados (EX) bem como a associação de ambos os fatores (EXA), todos com proliferação similar à do controle ($p > 0,05$). Na presença de tumor (SW), suplementação com óleo de fígado de tubarão (SWA), exercício físico (EXW) e associação do exercício com a suplementação (EXWA) este cenário basal também não se alterou quando se compara à dos animais com tumor bem como com os sem tumor ($p > 0,05$). A adição de concanavalina-A induziu a um pequeno aumento na proliferação de linfócitos do grupo controle (S), mas este não foi significativo ($p > 0,05$). No grupo suplementado (SA) a proliferação foi elevada em 2,3 vezes ($p < 0,05$) e no grupo exercitado (EX) em 1,7 vezes ($p < 0,05$). A associação de exercício físico e suplementação com óleo de fígado de tubarão (EXA) causaram elevação significativa de 8,1 vezes ($p < 0,001$) quando comparada à dos demais grupos sem tumor concanavalina-A estimulados. A presença do tumor teve forte efeito estimulador da proliferação na presença do mitógeno elevando esta em 18,4 vezes ($p < 0,001$). A suplementação com óleo de fígado de tubarão (SWA) elevou a proliferação linfocitária em 6,3 vezes ($p < 0,05$) e o exercício físico (EXW) em 15,7 vezes ($p < 0,05$). Associando exercício físico e suplementação com óleo de fígado de tubarão (EXWA) elevou a proliferação em 10 vezes ($p < 0,0001$), que foi significativamente maior que à da suplementação com óleo de fígado de tubarão isolada ($p < 0,01$), mas não foi diferente quando comparada à do exercício isoladamente ($p > 0,05$). Com exceção do grupo suplementado com óleo de fígado de tubarão, todos os demais tiveram proliferação significativamente maior quando comparada à de seus equivalentes sem tumor ($p < 0,05$).

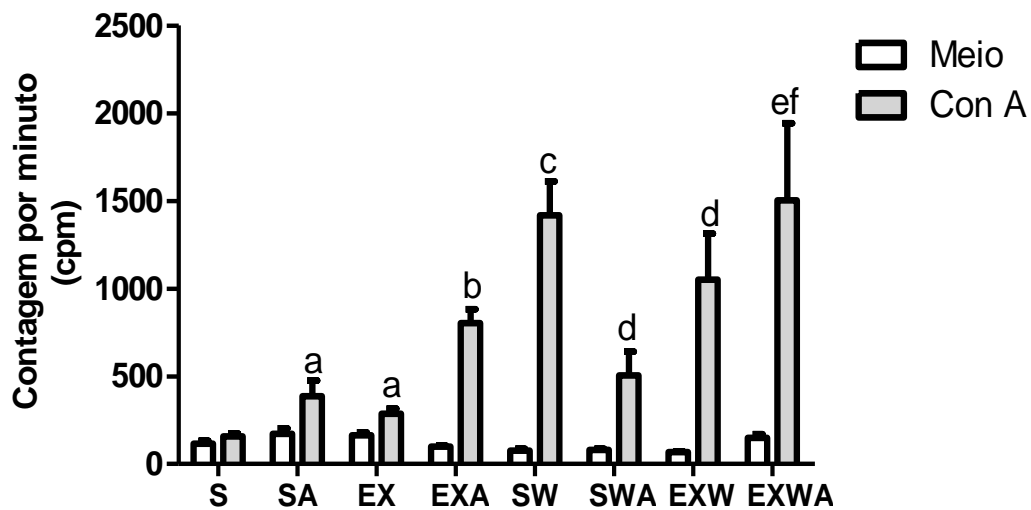


FIGURA 16. Proliferação de linfócitos do timo sem Con-A (barra branca) e estimulados com Con-A (barra cinza) (contagem por minuto) dos grupos sedentário (S); sedentário com suplementação de óleo de fígado de tubarão (SA); exercitado sem suplementação (EX); exercitado com suplementação de óleo de fígado de tubarão (EXA); sedentário portador de tumor (SW); sedentário portador de tumor e suplementado com óleo de fígado de tubarão (SWA); exercitado portador de tumor (EXW) e exercitado portador de tumor suplementado com óleo de fígado de tubarão (EXWA). Os dados estão apresentados como média \pm EPM de 14 para o grupo (S), 12 para o grupo (SA), 16 para o grupo (EX), 13 para os grupos (EXA, SWA e EXWA), 11 para o grupo (SW) e 8 para o grupo (EXW). ^a $p < 0,05$ quando comparado ao S (com estímulo). ^b $p < 0,0001$ quando comparado ao S, SA e EX (com estímulo). ^c $p < 0,001$ quando comparado ao S (com estímulo). ^d $p < 0,05$ quando comparado ao S (com estímulo). ^e $p < 0,0001$ quando comparado ao S (com estímulo). ^f $p < 0,001$ quando comparado ao SWA (com estímulo).

7 DISCUSSÃO

Estudos epidemiológicos têm estabelecido relação entre estilo de vida, dieta, tabagismo e sedentarismo, com o surgimento de muitas doenças crônico-degenerativas, particularmente o câncer (McTIERNAN, 2008; ROGERS et al., 2008).

A síndrome da caquexia está entre os aspectos mais debilitantes do indivíduo portador de tumor, caracterizada por catabolismo intenso das reservas de proteínas, gorduras e carboidratos (MaC DONALD et al., 2003). O paciente caquético grave apresenta grande perda de massa corporal, anorexia, saciedade precoce, fraqueza, anemia e edema (BARBER et al., 1999). Um tumor com capacidade de promover caquexia irá induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias, pelas células do sistema imunitário, que atuarão sobre diversos tecidos (PETERSEN; PEDERSEN, 2005). Adicionalmente, citocinas como o TNF e a IL-1, atuantes na indução da caquexia, foram demonstradas também serem produzidas pelas células tumorais (NOGUCHI et al., 1996).

O estabelecimento da caquexia em modelo animal é caracterizado pela presença de hipoglicemia, hiperlactatemia, hipertriacilglicerolemia, redução do conteúdo de glicogênio hepático e muscular e perda de peso (TOGNI et al., 2003; PINTO JÚNIOR et al., 2004; TISDALE, 2005). Os parâmetros bioquímicos de caquexia avaliados neste trabalho como conteúdo de glicogênio hepático e muscular, glicemia, lactatemia, concentração de triacilglicerol, (FIGURA 6, 7, 8, 9 e 10) e ganho de peso corporal (TABELA 1), estavam presentes no grupo com tumor demonstrando a presença de estado caquético. A alteração no metabolismo de lipídeos é caracterizado pelo aumento na sua mobilização, diminuição da lipogênese e redução na atividade da Lipase de lipoproteína (LPL), enzima responsável por diminuir as concentrações de triacilglicerol do plasma (TISDALE, 2000; INUI, 2002). Vários são os fatores que levam a alterações no metabolismo do lipídico. Tisdale (2000) sugeriu que o aumento de citocinas na circulação, decorrente da presença do tumor, inibe a LPL, que é responsável por reduzir extração de lipídeos do plasma para estoque no tecido adiposo e aumentar a

concentração de lipídeos sanguíneos. Fernandes e colaboradores (1990) demonstraram que em ratos portadores de tumor de Walker 256, a secreção de insulina estava reduzida pelas ilhotas pancreáticas resultando portando em hipoinsulinemia em que a LPL, portanto teria seu papel reduzido uma vez que esta enzima depende de insulina para sua função. Em adição, foi demonstrado que LPL também é inibida pelo TNF bem como as enzimas importantes para a síntese de novo de ácido graxo (ácido graxo sintase e acetil-CoA carboxilase (TORTI et al., 1985).

Outro fator relevante no quadro caquético induzido pelo tumor de Walker 256 é a perda acentuada de peso em todos os grupos, embora o grupo sedentário portador de tumor (SW) tenha apresentado a maior perda (TABELA 1). A perda de peso é maior em pacientes com câncer, pois o tumor possui alto consumo de energia e gera uma ineficiência energética, responsável pela maior utilização da glicose, diminuição do glicogênio intramuscular e hepático (SKIPWORTH et al., 2007). Outra via que parece estar envolvida na perda de massa corporal decorrente da caquexia é a expressão da proteína PIF, sintetizada e secretada por tumores que induzem a caquexia. Em estudo realizado por Lima (2008) que utilizou protocolo de treinamento de saltos, este foi capaz de diminuir cerca 12 % a expressão de PIF. A menor expressão de PIF, provavelmente, é um dos fatores responsáveis por influenciar a menor perda de peso corporal e o exercício físico é importante fator regulador da síntese e degradação protéica (SKIPWORTH et al., 2007). A via pela qual o exercício é capaz de alterar a expressão de PIF é desconhecida. Esse aumento da proteólise se dá devido a ativação da proteína quinase (PKC) que é responsável pela ativação da quinase da proteína I κ B (IKK) que leva a degradação de I κ B, proteína que inibe NF- κ B, que conseqüentemente libera as subunidades de NF- κ B, responsável por aumentar a expressão da via proteolítica ubiquitina-proteossoma, aumentando conseqüentemente a degradação protéica (ELEY; TISDALE, 2007). O exercício de salto foi capaz de diminuir a expressão de PIF. A menor expressão de PIF, provavelmente, é um dos fatores responsáveis por influenciar a menor perda de massa corporal (SKIPWORTH et al., 2007).

A prática de atividades físicas regulares e hábitos alimentares saudáveis são elementos significativos na prevenção e controle de alguns tipos de doenças (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2005). A atividade física oferece proteção contra a Doença Arterial Coronariana (DAC), câncer colorretal, câncer de mama, declínio cognitivo relacionado com a idade e todas as causas de mortalidade (HOLMES et al., 2005). A atividade física pode decrescer o risco para diferentes cânceres, por vários mecanismos, incluindo decréscimo de hormônios sexuais, hormônios metabólicos e inflamatórios, além de melhorar o sistema imunitário (McTIERNAN, 2008). O exercício físico moderado tem sido constantemente identificado como um elemento central na reabilitação para muitas doenças crônicas, obtendo êxito na melhoria da qualidade de vida e reduzindo a mortalidade por todas as causas. Recentes evidências sugerem que níveis moderados de atividade física pode mesmo reduzir o risco de morte por câncer de mama (HOLMES et al., 2005). O Colégio Americano de Medicina do Esporte recomenda que se realizem no mínimo 30 minutos de atividades físicas, com intensidade moderada, na maioria dos dias da semana. Para manutenção de condição saudável e independência física, também é necessário que uma pessoa adulta faça, pelo menos, duas vezes na semana, exercícios físicos que propiciem aumento ou manutenção dos níveis de massa muscular (ACSM, 2007). O treinamento de força intenso aumenta a síntese protéica, resultando em aumento de proteínas contráteis e hipertrofia muscular (KRAEMER et al., 1995). Já o treinamento de endurance (aeróbio) resulta em aumento da atividade das enzimas oxidativas musculares, elevação no número, tamanho, tipo de mitocôndrias, vascularização e VO_2 máx (HUNTER et al., 1987). Pacientes portadores de câncer de mama, submetidos a um protocolo de treinamento físico, que envolvia exercícios aeróbios e exercícios de força, durante 12 semanas, em paralelo ao tratamento convencional apresentaram menores níveis de fadiga e ansiedade, melhoria na condição aeróbia e força muscular, promovendo melhora na qualidade de vida dos pacientes (MILNE et al., 2007).

A utilização de um protocolo de treinamento que inclui exercícios de salto contra resistido, seguido de exercício aeróbio, possibilita estímulo ao crescimento

muscular, vascularização e ao metabolismo, possibilitando adaptações metabólicas importantes, relacionadas ao sistema energético e muscular (ZAMBON et al., 2003).

Aqui, relatamos uma redução de cerca de 25%, na massa tumoral em ratos submetidos ao protocolo de treinamento que envolvia exercícios de natação (predominantemente aeróbio) e exercícios de salto (predominantemente anaeróbio), quando comparados aos ratos sedentários e sem suplementação com óleo de fígado de tubarão (FIGURA 5). Os animais sedentários que foram suplementados, também apresentaram redução de aproximadamente 18% na massa tumoral. Quando se analisa a associação do exercício físico e suplementação com óleo de fígado de tubarão, encontra-se efeito aditivo das duas intervenções sobre o crescimento tumoral (FIGURA 5). Além disso, o exercício e a suplementação, isoladamente, bem como sua associação, foram capazes de amenizar algumas alterações metabólicas do quadro caquético (FIGURA 6, 7, 8 e 9). Estes achados corroboram outros publicados recentemente. Segundo Bacurau e cols. (2007), o treinamento de alta intensidade, 85 % do VO_2 máx, aumentou o tempo de vida de ratos portadores de tumor induzido, promovendo a redução da massa tumoral e prevenindo os indicadores de caquexia, sugerindo que o treinamento pode ser uma estratégia viável contra tumores. Westerlind et al.,(2003) reportaram retardo no crescimento tumoral em ratos que faziam 30 minutos de natação, 5 dias por semana, durante 8 semanas. Em adição, outros autores também demonstraram que ratos submetidos a um protocolo de exercício de salto, durante oito semanas apresentaram diminuição da taxa de crescimento tumoral, preservação da massa corporal e atenuação de alguns parâmetros metabólicos da síndrome da caquexia (NUNES, 2005; LIMA, 2008). O exercício pode influenciar o crescimento tumoral, resultando em regressão e atraso no crescimento (ZIELINSK et al., 2004). Além disso, também se apresenta como uma estratégia que pode ser adotada para combater a quebra de proteínas durante doenças crônicas, como o câncer (ZINNA et al., 2003).

Neste trabalho, a presença do tumor no grupo sedentário (SW) reduziu significativamente o conteúdo de glicogênio hepático e muscular, quando

comparado aos demais grupos (FIGURA 6 e 7). Conseqüência da alta atividade glicolítica presente nas células tumorais (FIGURA 8); contudo, ratos que foram submetidos a treinamento e suplementação, isoladamente, (SWA e EXW), se mostraram eficazes na preservação do conteúdo de glicogênio hepático e muscular, nos grupos portadores de tumor (FIGURA 6 e 7), quando comparado ao grupo (SW). Já a hipoglicemia, conseqüência de maior consumo de glicose pelo tumor, foi observada nos ratos do grupo (SW). A queda da glicemia deve-se ao alto consumo de glicose pelo tumor e conseqüente elevação da lactatemia (FERNANDES et al., 2000). Tanto a suplementação quanto o treinamento físico, isoladamente, foram capazes de atenuar o quadro hipoglicêmico, e a associação de ambas elevou adicionalmente a glicemia (FIGURA 8). A presença do exercício físico pode estar relacionada à menor utilização de glicose pelo tumor, menor concentração de lactato plasmático e conseqüentemente conservação das reservas de glicogênio muscular e hepático (LUCÍA et al., 2003).

Tumores sólidos têm como característica, pobre provisão de sangue, conseqüentemente isto leva a grande produção de lactato e alto consumo de glicose, via anaerobiose, a qual se torna o substrato metabólico predominante (FOLADOR et al., 2006). Elevada concentração de lactato estava presente no grupo sedentário portador de tumor (SW), com diminuição significativa nos grupos submetidos ao protocolo de exercício (EXW e EXWA). O exercício promove melhora na eficiência metabólica devido a mudanças na característica das fibras musculares esqueléticas e conseqüentemente menor produção de lactato, diminuindo a fadiga (LUCÍA et al., 2003). O lactato produzido é utilizado pelo fígado como precursor para a gliconeogênese, sintetizando glicose, que será utilizada tanto pelo tumor quanto pelo hospedeiro (YONES; NOGUCHI, 2000). Hipertriacilglicerolemia (FIGURA 10) foi encontrada nos ratos sedentários portadores de tumor (SW), porém os ratos portadores de tumor suplementados e exercitados (SWA, EXW, EXWA) apresentaram diminuição significativa da concentração plasmática de triacilglicerol.

Estudo realizado por Kryczyk (2008), utilizando o mesmo protocolo de treinamento, demonstrou que a suplementação com óleo de fígado de tubarão e o

exercício físico, isoladamente, foram hábeis em atenuar a proliferação das células tumorais, *ex vivo*, e que a associação do exercício físico com a suplementação óleo de fígado de tubarão diminuiu ainda mais a proliferação dessas células. Um possível mecanismo para explicar a menor taxa de proliferação celular no grupo sedentário suplementado com óleo de fígado de tubarão foi o aumento da apoptose em células tumorais decorrente da maior produção de lipoperóxidos (KRYCZYK, 2008). Ácidos graxos poliinsaturados são mais suscetíveis à peroxidação lipídica, particularmente, por possuírem duas ou mais insaturações. Dentre os compostos presentes no óleo de fígado de tubarão encontramos, em pequenas quantidades, moléculas de ácidos graxos poliinsaturados n-3. Tumores obtidos de ratos portadores do tumor de Walker-256 suplementados com óleo de peixe, rico em ácidos graxos n-3 (AG-n-3), apresentaram maior peroxidação lipídica do que ratos não suplementados (TOGNI et al., 2003; MUND et al., 2007). Além da presença de AG n-3 no óleo de fígado de tubarão há os alquilgliceróis, os quais são encontrados em quantidades bem maiores, que também proporcionam condições para peroxidação lipídica.

O óleo de fígado de tubarão é constituído de 30 a 50% por alquilgliceróis, gorduras formadas por uma cadeia hidrocarbônica, saturada ou insaturada, unida por ligação do tipo éter a uma das hidroxilas do glicerol. A presença de grupo metóxi (-OCH₃), no início da cadeia alifática em substituição ao hidrogênio, confere estimulação da resposta imunológica e imunomodulação, atividade antifúngica, e em culturas de células demonstraram ter efeitos citotóxicos sobre células tumorais e redução de metástases (BROHULT et al., 1986). O alquilglicerol é incorporado nos fosfolipídios das células e pode ativar um precursor análogo de éter lipídico dos segundos mensageiros e mediadores. Contudo, estudos já demonstraram que o alquilglicerol exerce atividade inibitória na permeabilidade endotelial, enquanto o aumento da permeabilidade está envolvido no processo angiogênico. Por outro lado, foi observado que a administração oral de alquilglicerol diminuiu um marcador endotelial denominado fator von Willebrand em tumor de ratos, sugerindo conseqüentemente um potencial antiangiogênico deste éter lipídico (PÉDRONO et al., 2004).

A progressão ou regressão do processo neoplásico é regulada por múltiplos fatores como reações inflamatórias, fatores angiogênicos, citocinas e hormônios (BRIGATI, 2002). O crescimento tumoral demanda grande quantidade de energia por parte do hospedeiro (TISDALE, 2005). E por esta razão, a vascularização em torno do tumor sólido deve ser aumentada para prover nutrientes para seu crescimento e disseminação. Esta nova vascularização é controlada por muitos fatores angiogênicos, um deles é o *Basic Fibroblast Growth Factor* (bFGF). O bFGF é um fator de crescimento multifuncional que estimula qualquer proliferação endotelial, migração ou secreção (PÉDRONO et al., 2007). As vias de sinalização de receptores bFGF envolvem fosfolipases C ou D, guiando a produção de segundos mensageiros tais como diacilglicerol (DAG), fosfatidilinositol ou ácido fosfatídico de fosfatidilcolina, ambos conhecidos ativadores da proteína quinase C (PKC). Portanto, alteração na transdução de sinal relacionado com DAG e ácido fosfatídico afeta o bFGF, induzindo a modificações das células endoteliais (PÉDRONO et al., 2007).

O exercício físico, em uma intensidade moderada, tem a característica de promover aumento da liberação de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10, podendo então, ter efeito direto na intensidade do quadro de caquexia (PETERSEN; PEDERSEN, 2005). Uma série de trabalhos recentes tem documentado que a atividade física ou aptidão física está correlacionada inversamente com baixos níveis de inflamação sistêmica. Isto sugere que mediadores inflamatórios podem agir como marcador do estado de saúde e estado patológico e isto parece ainda mais importante na atividade física (BRUUNSGAARD, 2005).

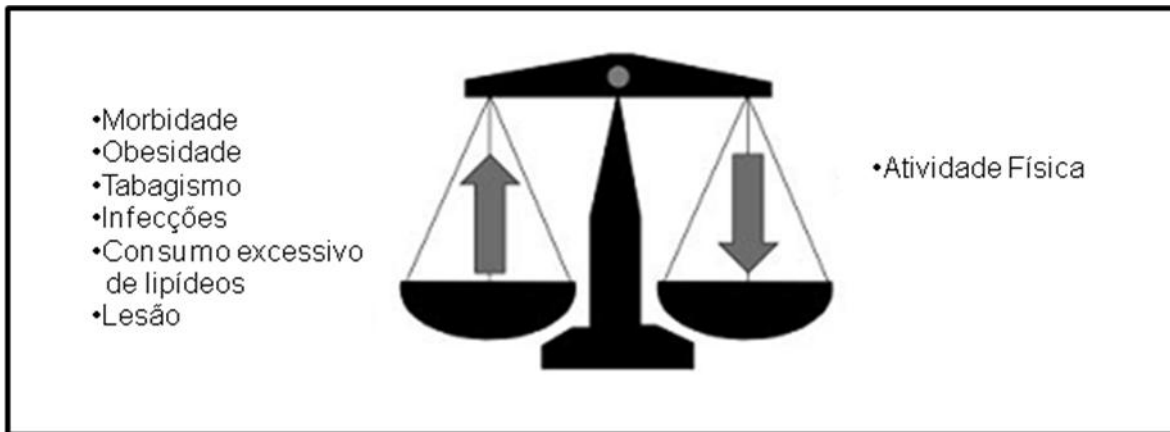


FIGURA 17: O ônus inflamatório na população idosa. Um vasto leque de fatores contribui para a inflamação sistêmica de baixo nível (BRUUNSGAARD, 2005).

Uma vez que já tem sido demonstrado que a atividade física é capaz de modificar o cenário metabólico e conseqüentemente levar a redução do estado caquético e tumoral, não se pode descartar a participação do sistema imunológico neste cenário, uma vez que o mesmo desempenha importante papel contra a tumorigênese e que o mesmo também pode ser modulado pelo exercício físico (CHUNG et al., 2005; NIEMAN; PEDERSEN, 1999). Para demonstrar a participação do sistema imunológico inato, na redução do crescimento tumoral, investigamos a funcionalidade imunológica do macrófago peritoneal. Macrófagos desempenham papel relevante tanto na imunidade natural quanto na imunidade adaptativa e fazem parte da primeira linha de defesa do sistema imunológico (COUTINHO, 2004).

O estresse promovido pelo exercício e a interação com o sistema imunitário proporciona uma excelente oportunidade para se estudar hormesis (do grego *hórmēsis* que significa “por rapidamente em movimento” (PEDERSEN; HOFFMAN-GOETZ, 2000). O exercício, na intensidade moderada, pode modificar positivamente a atividade anticâncer de neutrófilos e macrófagos por mecanismos envolvendo o aumento da expressão de moléculas de adesão, a qual pode contribuir para a diapedese e extravasamento dos neutrófilos para os tecidos (SMITH et al., 1996) e aumento da capacidade citotóxica (LU et al., 1999).

Neste estudo, os parâmetros imunitários determinados pela produção de ânion superóxido, peróxido de hidrogênio, atividade fagocítica e pelo volume lisossomal de macrófagos peritoneais, estavam significativamente elevados em todos os grupos portadores de tumor (SW, SWA, EXW e EXWA), quando comparados aos seus respectivos controles (S, SA, EX e EXA; FIGURA 11, 12, 13 e 14). Estes resultados sugerem que as células do sistema imunitário estavam ativadas e talvez influenciando negativamente o crescimento tumoral. O aumento da fagocitose por macrófagos e monócitos tem sido mostrados em outros estudos envolvendo AG n-3 e com protocolos envolvendo exercício (CALDER et al., 1990; CALDER, 1998; NUNES, 2005).

O exercício pode exercer tanto efeitos positivos quanto negativos sobre a função imunitária, além de menor suscetibilidade a doenças (NIEMAN, 1994). A relação entre volume e intensidade de exercício e suscetibilidade a infecções virais tem sido expresso na curva em forma de “J” (FIGURA 17). Este modelo sugere que um programa de atividade física moderada eleva a função imunitária para níveis superiores aos encontrados na população sedentária, entretanto, exercícios de alta intensidade e prolongado podem prejudicar a função imune (NIEMAN, 2000).

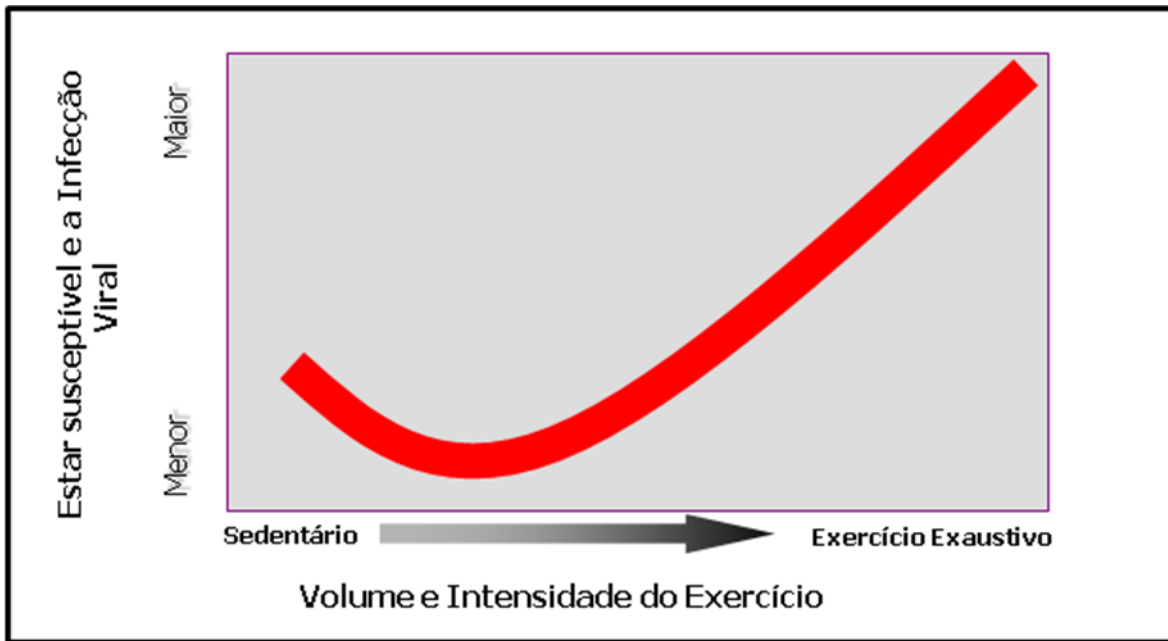


FIGURA 18. Relação da intensidade do exercício e susceptibilidade a infecções virais (NIEMAN, 2000).

Em relação à resposta imunitária de linfócitos T, avalia-se a sua capacidade proliferativa quando estimulados com con-A. A resposta proliferativa de linfócitos durante e após a prática de exercício físico é controversa entre os estudos. Para tal existem várias explicações possíveis como, por exemplo, diferença de intensidade, duração, nível de condicionamento físico e metodologia empregada para análise (PEDERSEN; GOETZ; 2000). Estudos em humanos indicam que a resposta proliferativa dos linfócitos estimulados com con-A declina durante 2 horas de exercício moderado, porém se eleva por várias horas após a atividade física (NIELSEN; PEDERSEN, 1997).

Nossos resultados mostram que a proliferação basal e estimulada dos linfócitos obtidos do linfonodo mesentérico e do timo foram bem diferente. Inicialmente, temos que o comportamento dos linfócitos obtidos do linfonodo mesentérico tiveram sua proliferação basal estimulada pela suplementação com óleo de fígado de tubarão e com o exercício físico, e isto não foi alterado quando foi associado ambos fatores. De fato, isto vai de encontro com os relatos de que tanto o exercício físico quanto alquilglicerol são imunoestimuladores (JONES; DEMARK-WAHNEFRIED, 2006; PÉDRONO et al., 2007). Na presença do tumor

isto não ocorreu basalmente. Mais interessante foi o comportamento dos linfócitos destes órgãos linfóides quando estimulados pelo mitógeno concanavalina-A, estimulador da proliferação dos linfócitos T. Linfócitos do linfonodo mesentérico tiveram expressiva proliferação tanto nos animais sem tumor quanto nos com tumor. O mesmo não foi observado com a mesma potencia nos linfócitos obtidos do timo. Estes dados nos permitem inferir que não se pode projetar informações a partir de experimentos com linfócitos obtidos de órgãos linfóides, como se fosse o comportamento de todo o sistema imunitário. Teleologicamente falando, talvez a resposta menor em determinados linfócitos de diferentes órgãos seja importante para não provocar excesso de ativação linfocitária, o que causaria efeito danoso aos tecidos do organismo devido ao excesso de citocinas produzidas. Finalmente, estes dados nos permitem também sugerir que o menor crescimento tumoral provavelmente teve a participação de linfócitos, contudo estes não foram a principal razão pela menor caquexia e crescimento tumoral, portanto estes desempenhariam papel coadjuvante no processo. Nós defendemos a idéia de que alquilglicerol e/ou outro componente contido no óleo de peixe seriam os principais responsáveis por tal ação. O exercício físico continua um enigma de como consegue atingir tal efeito. Acreditamos que o ambiente neuro-humoral-imunitário induzido pelo exercício físico seja o responsável pela ação antitumoral onde vários mediadores participam no processo de redução do crescimento tumoral e estabelecimento da caquexia.

CONCLUSÕES

- A prática de treinamento físico e a suplementação com óleo de fígado de tubarão, isoladamente, foram capazes de diminuir o tamanho do tumor e atenuar a instalação da síndrome da caquexia.
- A associação de ambos os tratamentos demonstraram efeito aditivo, reduzindo mais a massa tumoral.
- Em indivíduos não portadores de tumor, a prática de exercício e a suplementação com óleo de fígado de tubarão demonstraram capacidade em aumentar a atividade fagocítica e citotóxica de macrófagos peritoneais.
- A suplementação com óleo de fígado de tubarão e o exercício físico, isoladamente, elevaram a proliferação basal dos linfócitos. Na presença do tumor isto não ocorreu basalmente.
- A estimulação pelo mitógeno concanavalina-A promoveu aumento expressivo na proliferação, tanto nos animais sem tumor quanto nos com tumor.
- Estes resultados corroboram a hipótese de que o exercício físico e a suplementação com óleo de fígado de tubarão possuem papéis importantes no auxílio do tratamento de indivíduos portadores de tumor, modulando a atividade do sistema imunitário e promovendo melhorias no quadro metabólico geral do indivíduo.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AAGAARD, P. Making muscles "stronger": Exercise, nutrition, drugs. **Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interactions**, v. 4, n.2, p. 165-174, 2004.

ABBAS, A.; LICHTMAN, H. Imunidade celular e molecular. 5 ed .**Elsevier**, 2005.

AOI, W. *et al.* Oxidative stress and delayed-onset muscle damage after exercise. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 37, n. 4, p. 480 –487, 2004.

ALBERTS, B. *et al.* Biologia molecular da célula. 4^a ed., **Artmed**, Porto Alegre, 2004.

ALI, H. *et al.* Mechanisms of inflammation and leukocyte activation. **Medical Clinical of North American**, v. 81, p. 1-28, 1997.

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, jan. 2001.

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

ARGILÉS, J.M.; ALVAREZ, B.; LOPES-SORIANO, F.J. The metabolism basis of cancer cachexia. **Medical Research**, v. 17, n. 5, p. 477-98, 1997.

ARGILÉS, J. M. *et al.* Tumor growth and nitrogen metabolism in host. **International Journal of Oncology**, v. 14, n. 3, p. 479-86, 1999.

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

BACURAU, R. F. P. *et al.* Effect of a Moderate Intensity Exercise Training Protocol on the Metabolism of Macrophages and Lymphocytes of Tumour-bearing Rats. **Cell Biochemistry and Function**, v. 18, p. 249-258, 2007.

BARACOS, V. E. Cancer-associated cachexia and underlying biological mechanisms. **Annual Reviews Nutrition**, v. 26, p. 435–61, 2006.

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

BAUMAN, A. E. Updating the evidence that physical activity is good for health: an epidemiological review 2000–2003. **Journal of Science Medicine Sport**, v. 7, p. 6–19, 2004.

BEN-BARUCH, A. Inflammation-associated immune suppression in cancer the roles played by cytokines, chemokines and additional mediators. **Seminars in Cancer Biology**, v. 16, p. 38-52, 2006.

BONATTO, S. J. R. Avaliação da Resposta Imunitária em macrófagos de ratos F1, portadores de tumor de Walker 256, suplementados cronicamente com óleo de peixe. **Tese de Mestrado**, UFPR, Curitiba, 2003.

BOOTH, F. W.; LEES, S. J. Fundamental questions about genes, inactivity, and chronic diseases. **Physiol. Genom**, v. 28, 146–157, 2007.

BORISH, L. C; STEINKE, J. W. Cytokines and chemokines. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 111, p. 460-475, 2003.

BREEN, E. C. Pro and anti-inflammatory cytokines in human immunodeficiency virus infection and acquired immunodeficiency syndrome. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 95, p. 295-304, 2002.

BRIGATI, C. et al. Tumors and inflammatory infiltrates: friends or foes? **Clinical & Experimental Metastasis**, v. 19, n. 3, p. 247-58, 2002.

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

BROHULT, A. et al. Effect of alkoxyglycerols on the frequency of injuries following radiation therapy for carcinoma of the uterine cervix. **Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica**, v. 56, p. 441-448, 1977.

BROHULT, A. et al. Reduced mortality in cancer patients after administration of alkoxyglycerols. **Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica**, v. 65, p. 779-785, 1986.

BRUUNSGAARD, H. et al. TNF α , leptin, and lymphocyte function in human aging. **Life Sciences**, v. 67, p. 2721–2731, 2000.

BRUUNSGAARD, H. Physical activity and modulation of systemic low-level inflammation. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 78, 2005.

CABRERA-GOMEZ, C. M. et al. Exercise as na antioxidant: it up-regulates important enzymes for cell adaptations to exercise. **Science & Sports**, v. 21, p. 85-89. 2006.

CALDER, P. C. et al. Uptake and incorporation of saturated and unsaturated fatty acids into macrophage lipids and their effects upon macrophage adhesion and phagocytosis. **Biochemistry Journal**, v. 296, p. 807-814, 1990.

CALDER, P. C. Dietary fatty acids and the immune system. **Nutrition reviews**, v. 56, p. 70-83, 1998c.

CALLARD, R. E.; MATHEUS, D. J.; HIBBERT, L. IL-4 and IL-13 receptors: are they one or same? **Immunology Today**, v. 17, p. 108-110, 1996.

CANNON, J. G. Exercise and resistance to infection. **Journal of Applied Physiology**, v. 74, p. 973-981, 1993.

CARMEN SÁEZ, M. et al. Exercise-induced stress enhances mammary tumor growth in rats: Beneficial effect of the hormone melatonin. **Molecular and Cellular Biochemistry**, 2006.

CASSATELLA, M. A. et al. Interleukin-10 (IL-10) inhibits the release of proinflammatory cytokines from human polymorphonuclear leukocytes. Evidence for an autocrine role of tumor necrosis factor and IL-1 in mediating the production of IL-8 triggered by lipopolysaccharide. **Journal of Experimental Medicine**, v. 178, p. 2207-2211, 1993.

CHUNG, H.Y. et al. Exercise and inflammatory diseases: beneficial effects of exercise as a stimulus of hormesis. In: Radak, Z. (Ed.), **Exercise and Diseases, Meyer Sport**, Oxford, p. 17–50, 2005.

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

COUTINHO, M. M. Efeito do treinamento moderado sobre o metabolismo de macrófagos de ratos envelhecidos. **Tese de Doutorado**, USP, São Paulo, 2004.

CURI, T. C .P. et al. Percentage of phagocytosis, production of O_2^- , H_2O_2 and NO, and antioxidant enzyme activities of rats neutrophils in culture. **Cell Biochemistry and Function**, v. 16, p. 43-49, 1998.

De VISSER, K. E., EICHTEN, A., COUSSENS, L. M. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. **Nature Review Cancer**, v. 6, p. 24-37, 2006.

DOBROVOLSKAIA, M. A.; KOZLOV, S. V. Inflammation and cancer: when NF-KappaB amalgamates the perilous partnership. **Current Cancer Drug Targets**, v. 5, p. 325-344, 2005.

DUNLOP, R. J.; CAMPBELL, C. W. Cytokines and advanced cancer. **Journal of Pain and Symptom Management**, v. 20, p. 214-232, 2000.

DUNN, G. P.; OLD, L. J.; SCHREIBER, R. D. The three Es of cancer immunoediting. **Annual Reviews of Immunology**, v. 22, p. 329-360, 2004.

ELEY, H.; TISDALE, M. J. Skeletal muscle atrophy, a link between depression of protein synthesis and increase in degradation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 10, p. 7087-7097, 2007.

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

FEARON, K. C.; PRESTON, T. Body composition in cancer cachexia. **Infusions therapie**, v. 3, n. 17, p. 63–66, 1990.

FERNANDES, L. C. et al. Insulin secretion in Walker 256 tumor cachexia. **American Journal of Physiology**, v. 258, p. 1033-1036, 1990.

FERNANDES, L. C. et al. Improvement of cancer cachexia and inhibition of tumor growth by insulin administration in rats. **Cancer Therapy and Control**, v. 1, p. 259-268, 1991.

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

FERNANDES, L. C. et al. The central role of insulin for the establishment of cachexia in Walker 256 tumor-bearing rats. **Cancer Research Therapy & Control**, v. 10, p. 109-118, 1999.

FICKENSCHER, H. et al. The interleukin-10 family of cytokines. **Trends in immunol. Rev.**, v. 23, n. 2, p. 89-96, 2002.

FIORENTINO, D. F. et al. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. **Journal of Immunology**, v. 147, p. 3815-3822, 1991.

FOGEHOLM, M.; KUKKONEN-HARJULA, K. Does physical activity prevent weight gain – a systematic review. **Obesity Review**, v. 1, p. 95-111, 2000.

FOLADOR, A. et al. Effect of fish oil supplementation for 2 generations on changes in macrophage function induced by Walker 256 cancer cachexia in rats. **International Journal of Cancer**, v. 120, p. 344–350, 2006.

GADINA, M. et al. Signalling by type I and II cytokine receptors: ten years after. **Current Opinion Immunology**, v. 13, p. 363-373, 2001.

GORDON, J. N.; GREEN, S. R.; GOGGIN, P. M. Cancer cachexia. **Q. Journal of Medicine**, v. 98, p. 779-788, 2005.

HADEN, J. W. Immunodeficiency and cancer: prospects for correction. **International Immunopharmacology**, v. 3, p. 1061-1071, 2003.

HANAHAH, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cellular**, v. 100, p. 57-70, 2000.

HUNTER, G.; DEMMENT, R.; MILLER, D. Development of strength and maximum oxygen uptake during simultaneous training for strength and endurance. **Journal Sports Medicine**, v. 27, p. 269-275, 1987.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J. M. C. Free radical in biology and medicine. 3rd ed. **Oxford**: University Press, 1999.

HART, P. H. et al. Potential anti-inflammatory effects of interleukin-4: supression of human monocyte tumor necrosis, interleukin-1 and prostaglandin E2. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Sci. USA., v. 86, p. 3803-3807, 1989.

HESPEL, P. et al. Oral creatine supplementation facilitates the rehabilitation of disuse atrophy and alters the expression of muscle myogenic factors in humans. **Journal of Physiology**, v. 536, n.2, p. 625-633, 2001.

HOLLMANN, W.; HETTINGER, T. Medicina do esporte: fundamentos anatômico-fisiológicos para a prática esportiva. 4. ed., **Manole**, Barueri, 2005.

HOLMES, M. D, CHEN, W. Y, FESKANICH, D. *et al.* Physical activity and survival after breast cancer diagnosis. **Obstetrical & Gynecological Survey**, v. 60, n. 12, p. 798-800, 2005.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER; Ministério da Saúde. Incidência de Câncer no Brasil: dados dos registros de câncer de base populacional. Rio de Janeiro (Brasil): INCA; 2008. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2008>.

INUI, A. Cancer anorexia-cachexia syndrome: current issues in research and management. **CA Cancer Journal for Clinicians**, v. 52, n. 2, p. 72-91, Mar/Apr. 2002.

JANEWAY, C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. CAPRA, J. D. Imunobiologia: o sistema imunológico na saúde e na doença. Porto Alegre: **Artes Médicas Sul**, 2000.

JONES, L. W.; DEMARK-WAHNEFRIED, W., Diet, exercise, and complementary therapies after primary treatment for cancer. **Lancet Oncology**, v. 7, p. 1017-26, 2006.

KAMOSHIDA, S. et al. Expression of cancer cachexia-related factors in human cancer xenografts: an immunohistochemical analysis. **Biomedical Research**, v. 27, n. 6, p. 275-81, Dec. 2006.

KARIN, M. NF- κ B and cancer: mechanisms and targets. **Molecular Carcinogenesis**, v. 45, p. 355-361, 2006.

KEAST, D.; CAMERON, K.; MORTON, A. R. Exercise and the immune response. **Sports Medicine**, v. 5, p. 248-267, 1988.

KETELHUT, R. G.; FRANZ, I. W.; SHOLZE, J. Regular exercise as an effective approach in antihypertensive therapy. **Medicine Science Sports Exercise**, v. 36, p. 4-8, 2004.

KIZAKI, T. et al. Adaptation of macrophages to exercise training improves innate immunity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 372, p. 152-156, 2008.

KOTENKO, S. V. The family of IL-10-related cytokines and their receptors: related, but to what extent? **Cytokine & Growth Factor Rev**, v. 13, p. 223-240, 2002.

KRAEMER, W. J. et al. Compatibility of high intensity strength and endurance training on hormonal and skeletal muscle adaptations. **Journal Applied Physiology**, v. 78, n. 3, p. 976-989, 1995.

KRYCZYK, Marcelo. Treinamento de salto e natação associado à suplementação com óleo de fígado de tubarão diminui crescimento tumoral e atenua a instalação da síndrome da caquexia em ratos portadores do tumor de Walker 256. . **Dissertação de mestrado**. UFPR, Curitiba/PR, 2008.

LEE, I. M. Physical Activity and Câncer Prevention – Data from Epidemiologic Studies. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, 2003.

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.

LIMA, C. et al. Anaerobic exercise reduces tumor growth, cancer cachexia and increases macrophage and lymphocyte response in Walker 256 tumor-bearing rats. **European Journal of Applied Physiology**, v. 104, p. 957-964, 2008.

LU, Q. et al. Chronic exercise increases macrophage-mediated tumor cytotoxicity in young and old mice. **American Journal of Physiology**, v. 276, n. 2, p. 482-489, 1999.

LUCÍA, A.; EARNEST, C.; PÉREZ, M. Câncer-related fatigue: can exercise physiology assist oncologist? **The Lancet Oncology**, v. 4, p. 616-625, 2003.

MADHAVI, N.; DAS, V.N. Effects of n-3 and n-6 fatty acids on the survival of vinorelbine sensitive and resistant human cervical carcinoma cells, in vitro. **Cancer Letters**, v. 84, p. 31-41, 1994.

MAUGHAN, R.; GLEESON, M.; GREENHAFF, P. L. Bioquímica do exercício e do treinamento. 1 ed. **Manole**, Barueri, 2000.

MACDONALD, N.; EASSON, A. M.; MAZURAK, V.Z.; DUNN G.P.; BARACOS, V.E. Understanding and Managing Cancer Cachexia. **Journal of the American College Surgeons**, v. 197, p. 143-161, 2003.

MCNEELY, M. L. et al. Effects of exercise on breast cancer patients and survivors: a systematic review and meta-analysis. **Canadian Medical Association Journal**, v. 175, p. 34-41, 2006.

MCTIERNAN, A. Mechanisms linking physical activity with cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 8, n. 3, p. 205-211, 2008.

MILNE, H. M. et al. Effects of a combined aerobic exercise program in breast cancer survivors: a randomized controlled trial. **Breast Cancer Research and Treatment**, 2007.

MUND, R. C. et al. Decreased tumor growth in Walker 256 tumor-bearing rats chronically supplemented with fish oil involves COX-2 and PGE2 reduction associated with apoptosis and increased peroxidation. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 76, p. 113-120, 2007.

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

MORLEY, J. E.; THOMAS, D. R.; WILSON, M. M. Cachexia: pathophysiology and clinical relevance. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 83, p. 735-43, 2006.

MOORE, K. W. et al. Interleukin-10 and Interleukin-10 receptor. **Annual Review of Immunology**, v. 19, p. 683-765, 2001.

MUTRIE, N. et al. Benefits of supervised group exercise programme for women being treated for early stage breast cancer: pragmatic randomised controlled trial. **BMJ Publishing Group**, 2007.

NIELSEN, H. B.; PEDERSEN, B. K. Lymphocytes proliferation in response to exercise. **European Journal of Applied Physiology**, v. 75, p. 375-379, 1997.

NIEMAN, D. C. et al. Infections episodes in runners before and after the Los Angeles Marathon. **Journal of Sports Medicine and Physical Fitness**, v. 30, p. 316-328, (1990a).

NIEMAN, D. C. et al. The effects of moderate exercise training on natural killer cells and acute upper respiratory tract infections. **International Journal of Sports Medicine**, v. 11, p. 467-473, 1990b.

NIEMAN, D. C. et al. Moderate exercise training and natural killer cell cytotoxic activity in breast cancer patients. **International Journal of Sports Medicine**, v. 16, p. 334-337, 1994.

NIEMAN, D. C.; PEDERSEN, B. K. Exercise and immune function. Recent development. **Sports and Exercise**, v. 27, n. 2, p. 73-80, 1999.

NIEMAN, D. C. Is infection risk linked to exercise workload? **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 32, n. 7, p. 406-411, 2000.

NOGUCHI, Y. et al. The possible role of TNF-alpha and IL-2 in inducing tumor associated metabolic alterations. **Surgery Today**, v. 26, p. 36-41, 1996.

NUNES, E. A. Efeito do treinamento de saltos e da suplementação com β -hidroxi- β -metilbutirato sobre o crescimento tumoral, caquexia e parâmetros imunitários de ratos portadores do tumor de Walker 256. **Dissertação de mestrado**. UFPR, Curitiba/PR, 2005.

OPAL, S. M.; DEPALO, V. A. Anti-inflammatory cytokines. **Impact of Basic Research on Tomorrows' Medicine**, v. 117, p. 1162-1172, 2000.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. 2005. Disponível em: <http://www.opas.org.br>. Acesso em: fevereiro de 2007.

PACKARD, A.; KHAN, M. M. Effects of histamine on Th1/Th2 cytokine balance. **International Immunoph.**, v. 3, p. 909-9201, 2003.

PEDERSEN, B. K., BRUUNSGAARD, H. How physical exercise influences the establishment of infections. **Sports Medicine**, v. 19, p. 393, 1995.

PEDERSEN, B. K.; HOFFMAN-GOETZ, L. Exercise and the immune system: regulation, integration, and adaptation. **Physiology Rev.**, v. 80, p. 1055-1081, 2000.

PEDERSEN, A. M.; PEDERSEN, B. K. The anti-inflammatory effect of exercise. **Journal of Applied Physiology**, v. 98, p. 1154-2262, 2005.

PÉDRONO, F. et al. Natural alkylglycerols restrain growth and metastasis of grafted tumors in mice, **Nutrition and Cancer**, v. 48, p. 64-69, 2004.

PÉDRONO, F. et al. 1-O-Alkylglycerols reduce the stimulating effects of bFGF on endothelial cell proliferation in vitro, 2007.

PIETRAS, R. J.; WEINBERG, O. K. Antiangiogenic Steroids in Human Cancer Therapy. David Geffen **School of Medicine at UCLA**, v.2, p.49-57,2005.

PIFFAR, P. M., et al. Naproxen, clenbuterol and insulin administration ameliorates cancer cachexia and reduce tumor growth in Walker 256 tumor-bearing rats. **Cancer Letters** v. 201, p. 139–148, 2003.

PINTO JÚNIOR, A. et al. Fish oil supplementation in F1 generation associated with naproxen, clenbuterol, and insulin administration reduce tumor growth and cachexia in Walker 256 tumor-bearing Rats. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 15, p. 358–365, 2004.

PIPE, R. K.; COLES, J. A.; FARLEY, S. R. Assays for measuring immune response in the mussel *Mytilus edulis*. Tech. **Fish Immunology**, v. 4, p. 93-100, 1995.

REID, M. B.; LI, Y.P. Cytokines and oxidative signaling in skeletal muscle. **Acta Physiology Scand**, v. 171, p. 225-232, 2001.

ROGERS, C. J. et al. Physical activity and cancer prevention: pathways and targets for intervention. **Sports Medicine**, v. 38, n. 4, p. 271-96, 2008.

RUSSEL, S. T., ELEY, H., TISDALE, M. J. Role of reactive oxygen species in protein degradation in murine myotubes induced by proteolysis-inducing factor and angiotensin II. **Cellular Signalling**, v. 19, p. 1797-1806, 2007.

SKIPWORTH, R. J. E. et al. Pathophysiology of cancer cachexia: Much more than host–tumour interaction? **Journal Clinical Nutrition and Metabolism**, 03.011, 2007.

SMITH, J. A. et al. Moderate exercise triggers both priming and activation of neutrophil subpopulations. **American Journal of Physiology**, v. 270, n. 4, p. 838-845, 1996.

STALLION, A. et al. Effects of increased β 2-Agonist dose in tumor-bearing animals. **Nutrition and Cancer**., v. 20, n. 3, p. 251-260, 1993.

SWANN, J. B.; SMYTH, M. J. Immune surveillance of tumors. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 5, p. 1137-1146, 2007.

TISDALE M. J. Cancer cachexia, metabolic alterations and clinical manifestations. **Nutrition**, v. 13, p. 1-7. 1997.

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

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

TISDALE, M. J. Cancer cachexia. **Langenbecks Archives of Surgery**, v. 389, p. 299-305, 2004.

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

TOGNI, V. et al. Cancer cachexia and tumor growth reduction in Walker 256 tumor-bearing rats supplemented with n-3 polyunsaturated fatty acids for one generation. **Nutrition and Cancer-An International Journal**, EUA, v. 46, n. 1, p. 52-58, 2003.

TORTI, F. M. et al. A macrophage factor inhibits adipocyte gene expression: an "in vitro" model of cachexia. **Science**, v. 229, p. 867-869, 1985.

VALKO, M., RHODES, C. J, MONCOL, J., IZAKOVIC, M., MAZUR, M.. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interact.**, v. 160, n. 1, p. 1-40, 2006.

VISSERS, Y. L. J. et al. Protein breakdown on whole-body and organ level in non-cachectic tumour-bearing mice undergoing surgery, 2007.

WEINECK, J. *Biologia do esporte*. 7 ed. Manole, **Barueri**, 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.

WILLIAMS, J. I. et al. Squalamine treatment of human tumors in nu/ni mice enhances platinum-based chemotherapies. **Clinical Cancer Research**, v. 7, p. 724-733, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Physical activity and health in Europe: evidence for action. **Printed in Denmark**, 2006.

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

ZIELINSKI, M. R. et al. Exercise delays allogeneic tumor growth and reduces intratumoral inflammation and vascularization. **Journal of Applied Physiology**, v. 96, n. 6, p. 2249-2256, 2004.

ZAMBON, A. C. et al. Time and exercise-dependent gene regulation in human skeletal muscle. **Genome Biology**, v. 4, n. 10, p. 61, 2003.

ZINNA, E. M.; YARASHESKI, K. E. Exercise treatment to counteract protein wasting of chronic diseases. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 6, n. 1, p. 87-93, 2003.