

DIOGO KUCZERA

**SUPLEMENTAÇÃO CRÔNICA DA DIETA COM β -HIDROXI β -
METILBUTIRATO (HMB) E TREINAMENTO CONTRA-RESISTIDO
REDUZEM A TAXA
DE CRESCIMENTO DO TUMOR DE WALKER 256.**

Identificação dos mediadores participantes neste processo.

CURITIBA
2007

DIOGO KUCZERA

**SUPLEMENTAÇÃO CRÔNICA DA DIETA COM β -HIDROXI β -
METILBUTIRATO (HMB) E TREINAMENTO CONTRA-RESISTIDO
REDUZEM A TAXA
DE CRESCIMENTO DO TUMOR DE WALKER 256.**

Identificação dos mediadores participantes neste processo.

Dissertação apresentada para
obtenção do título de Mestre no
curso De Pós-Graduação em
Biologia Celular, do Setor de
Ciências Biológicas, da
Universidade Federal do Paraná.

Orientação: Prof. Dr. Luiz Cláudio
Fernandes.

CURITIBA
2007

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a DEUS por me dar a oportunidade de poder realizar o sonho de fazer este Mestrado.

Ao meu CHEFE, pela paciência, amizade e exemplo de liderança. Obrigado por me ajudar a galgar mais esta etapa da minha vida e por me mostrar o real significado da palavra CHEFE.

Aos amores da minha vida, minha Mãe e minha Mica. Minha mãe por ser esta mulher extraordinária que é batalhadora que eu admiro tanto e que eu tenho certeza que fez e tem feito o possível e o impossível por mim. Minha Mica (MMLM) por ser uma pessoa maravilhosa que eu admiro e espero passar o resto da minha vida ao lado cheio de Bóbs e com os nossos bacuris de cabelo enrolado e nariz sujo. Obrigado por vocês existirem. Amo vocês pra sempre.

A minha Família de sangue (Junior, Jú, Niki, Deborah, Dani, Dudu, Felipe, Ale, Gordo) pelo apoio e pelo fato de me fazer minha vida mais feliz. A família que Deus pôs na minha vida Tercio, Filho, Ed, Tody, André, Matatias. Vocês são muito importantes para mim.

A minha família que está no céu PAI e VÓ CONCEIÇÃO por tantas vezes me escutarem.

P.S. Taí Paiiiii! Você que sempre me ensinou que os estudos devem vir em primeiro lugar, faz festa aí por nós!

A minha POLACA (Rebeca) por esse amor incondicional e por ser a cachorra mais linda do mundo.

Aos amigos do LabMetab, Rica, Rica chairs, Fernando, Loli, Fabiola, Everson, Carine, Carina, Pauuuloo, Luis M., Lú Loira, Lú (TV velha), Sérgio, Gleisson, Isa, Marcio, Fer, Katya, Cris, Marcelo, Jaisson, Andressa, Mau, Sandrinho e Vanessa. Vocês fazem parte desse

trabalho e sem vocês seria impossível completá-lo. Cada um de vocês teve um papel neste pedaço da minha vida.

Ao professor Dr. Célio Miyasaka por aceitar prontamente o pedido de argüir o presente trabalho. Muito Obrigado.

Ao professor Dr. Silvio Zanata, por aceitar o convite para compor a banca e pelas imprescindíveis explanações sobre Western Blotting. Obrigado.

A professora Cristina Marcondes pelos anticorpos cedidos.

Ao Luizão do biotério.

Aos animais utilizados.

Desculpem se eu esqueci de alguém.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
RESUMO.....	xi
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO01
1.1. Câncer	01
1.2. Caquexia	02
1.3. Anorexia	05
1.4. Alterações energéticas	06
1.5. Alterações do metabolismo do tecido adiposo	07
1.6. Alterações do metabolismo do tecido muscular	08
1.7. Fatores envolvidos no catabolismo tecidual no câncer	10
1.7.1. Citocinas	11
1.7.2. PIF	12
1.8. NF-kB.....	13
1.9. PIF, NF-kB e câncer.....	16
1.10. ERK e tumorigênese	17
1.10.1. ERK e PIF	19
1.11. Apoptose	20
1.11.1. Bcl-2 e Bax	20
1.12. β -hydroxy- β -methylbutyrate (HMB).....	22
1.12.1. HMB e câncer	23
1.13. Treinamento contra-resistido e câncer	24

2. OBJETIVOS	27
3. MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1 MODELO EXPERIMENTAL, PROCEDIMENTOS E REAGENTES.....	28
3.1.1. Animais	28
3.1.2. Enzimas, Reagentes e HMB	28
3.1.3. Modelo Experimental	28
3.1.4. Pesagem dos indivíduos e tumores	29
3.1.5. Protocolo de treinamento	29
3.1.6. Suplementação com HMB	30
3.1.7. Ortotanásia dos indivíduos	30
3.2. METODOLOGIA PARA ENSAIOS ENVOLVENDO CÉLULAS DO TUMOR DE WALKER 256	30
3.2.1. Implantação do tumor	30
3.2.2. Proliferação celular	31
3.2.3. Apoptose das células de tumor de Walker 256 por citometria de Fluxo (FACS)	32
3.3. Quantificação proteica das amostras	33
3.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida com docecil sulfato de sódio (SDS- PAGE)	33
3.4.1. Separação eletroforética de proteínas	34
3.5. Western Blotting.....	34
3.6. Análise Estatística.....	35

4. RESULTADOS	36
4.1. Peso Tumoral.....	36
4.2. Proliferação de células do tumor de Walker 256.....	37
4.3. Análise das células de tumor de Walker 256 por Citometria de fluxo (FACS).....	38
4.4. Western Blotting de proteínas do tumor de Walker 256.....	41
5. DISCUSSÃO	47
6. CONCLUSÕES	55
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema representativo do Ciclo de Cori.....	03
Figura 2 - Síntese e degradação de ácidos graxos no tecido adiposo na presença de tumor.....	08
Figura 3 - Sistema Proteolítico Ubiquitina-proteossoma ATP dependente.....	10
Figura 4 – Membros da Família NF-κB de fatores de transcrição.....	14
Figura 5 - Ativação de NF-κB, em células tumorais.....	15
Figura 6 - Mecanismo de ação do Fator indutor de proteólise (PIF) no mecanismo proteolítico envolvido na caquexia.....	17
Figura 7 - Via de sinalização de Ras-Raf-MEK-ERK.....	19
Figura 8 - Regulação da apoptose pela família Bcl-2 de proteínas.....	22
Figura 9 - Peso do tumor.....	36
Figura 10 - Proliferação das células de tumor de Walker 256, cultivadas, <i>ex vivo</i> , durante 24 horas na presença de (2- ¹⁴ C)-Timidina em DNA.....	37
Figura 11 - Células do tumor de Walker 256 marcadas com anexina V-FITC.....	39
Figura 12 - Apoptose (%) de células obtidas do tumor de Walker 256.....	40
Figura 13 - Expressão da proteína Bcl-2 no tecido tumoral.....	41
Figura 14 - Expressão da proteína Bax no tecido tumoral.....	42
Figura 15 - Expressão da subunidade P65 do NF-κB no tecido tumoral.....	43
Figura 16 - Expressão da subunidade P52 do NF-κB no tecido tumoral.....	44
Figura 17 - Expressão da proteína IκB no tecido tumoral.....	45
Figura 18 - Expressão da proteína fator de indução de proteólise (PIF) no tecido tumoral.....	46

Figura 19 - Relação entre a expressão das proteínas anti e pró-apoptóticas da família Bcl-2 e o destino celular de apoptose ou sobrevivência 52

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPC- Monofosfato de adenosina cíclico.
APP - Proteínas de fase aguda.
APS – Persulfato de amônio.
ATP- Adenosina trifosfato.
BSA – Albumina bovina sérica.
CRH - Hormônio liberador de corticotropina.
CRP - Proteína C reativa.
EDL – Músculo extensor longo dos dedos.
ERK – Quinase regulada por sinal extracelular.
HRP – Horseradish peroxidase.
HSL - Lipase hormônio sensível.
IGF-1 – Fator de crescimento parecido com a insulina.
I κ B - Proteína inibitória do fator de transcrição nuclear κ B.
IKK – Quinase da proteína I κ b.
IL-1 – Interleucina 1.
IL-6 – Interleucina 6.
INF- α – Interferon alfa.
INF- γ – Interferon gama.
KIC - Cetoisocaproato.
LMF- Fator mobilizador de lipídeos.
LIF - Fator Inibitório de Leucemia.
LPL - Lipase lipoprotéica.
MAPK – Proteína quinase ativada por mitógeno.
MEK – Proteína quinase ativada por mitógeno.
NF- κ B - Fator de transcrição nuclear κ B.
NYP - Neuropeptídeo Y.
PBS – Tampão fosfato salino.
PGE₂ - Prostaglandina-E₂.
PIF – Fator de indução de proteólise.
PKC – Proteína quinase C.
RTK – Receptor com atividade tirosina quinase.
SDS – Dodecil sulfato de sódio.

SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio.

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa.

UCP2 e UCP3 - Proteínas desacopladoras 2 e 3.

Ub – Ubiquitina.

VEGF - Fator de crescimento de endotélio e vasos.

15-HETE - Ácido 15-hidroxi-eicosatetraenóico.

RESUMO

Vários estudos têm mostrado que a suplementação tanto com o aminoácido Leucina, quanto com seu metabólito, o β -hidróxi- β -metilbutirato (HMB), leva a incremento dos parâmetros imunitários. Além disso, o HMB reduz o quadro de hipercatabolismo presente na caquexia em pacientes com câncer. A realização de exercício físico moderado tem sido demonstrado ser útil em amenizar o quadro hipercatabólico, bem como melhorar as funções imunitárias dos indivíduos com câncer. O objetivo deste estudo foi investigar a associação do exercício físico contra-resistido com a suplementação com HMB em ratos portadores do tumor de Walker 256. Ratos Wistar, 70 dias de idade, foram suplementados com HMB (76 mg/kg/dia) por gavagem e submetidos a treinamento físico que consistiu na realização de 10 séries de saltos (com sobrecarga relativa a 50% do peso corporal acoplada ao tronco) por dia, com duração de 30 segundos cada e intervalos de 1 minuto entre as séries, 4 vezes por semana durante 8 semanas. Após 6 semanas treinamento foi injetado 3×10^7 células de suspensão de células do tumor de Walker 256 (1mL) nos ratos onde estabeleceu-se os grupos a seguir: Sedentário portador de tumor (SW), sedentário portador de tumor suplementado com HMB (SHW), Exercitado portador de tumor (EXW) e Exercitado portador de tumor suplementado com HMB (EXHW). Duas semanas após a inoculação do tumor no flanco direito os animais foram ortotanasiados, o tumor removido, pesado e as células submetidas a estudo quanto à proliferação celular pela incorporação de (2- 14 C)-timidina em DNA, apoptose utilizando anexina-V-FITC em citometria de fluxo, a expressão das proteínas Bcl-2, Bax, subunidades P65 e P52 do fator de transcrição nuclear kB, proteína inibitória deste fator do NF-kB (I κ B) e fator de indução de proteólise (PIF) foram determinadas por *western blotting*. A massa tumoral dos animais dos grupos exercitados (EXW) e exercitados e suplementados com HMB (EXHW) foi significativamente menor quando comparada à dos demais grupos ($p < 0,05$). A proliferação celular das células destes mesmos grupos, em cultura, também foi menor e houve efeito aditivo do treinamento e suplementação ($p < 0,05$). As células tumorais dos animais exercitados apresentaram maior taxa de apoptose ($p < 0,05$) que à do grupo controle (SW). A suplementação com HMB não induziu a alteração significativa na expressão da Bcl2. Por outro lado, a atividade física foi hábil em promover redução em 40,5% na expressão da Bcl2 no grupo EXW ($p < 0,05$ vs. SW e SHW). A associação da atividade física com a suplementação incrementou esta redução para 58,5% quando comparada à dos grupos sedentários ($p < 0,01$ vs. SW e SHW). Quanto à Bax, a atividade física induziu a um aumento de 1,7 vezes na sua expressão quando comparada à do grupo SW ($p < 0,05$), mas não foi diferente quando comparada à do SHW ($p > 0,05$). A associação da atividade física e suplementação com HMB elevou a expressão da Bax em 2,5 vezes quando comparada à SW ($p < 0,05$), e em 1,7 vezes quando comparada à do SHW ($p < 0,05$). A suplementação com HMB reduziu a expressão da p65 em 1,5 vezes ($p < 0,05$ vs. SW). A atividade física levou a uma redução de 1,75 vezes que foi significativa quando comparada à do SW ($p < 0,01$), mas não em relação à do SHW ($p > 0,05$). A associação da atividade física e suplementação reduziu a expressão em 6 vezes quando comparada à do SW ($p < 0,001$), em 4 vezes à do SHW ($p < 0,05$) e em 3,4 vezes à do EXW ($p < 0,05$). A expressão da subunidade P52 não mostrou ser significativamente diferente entre os grupos

($p > 0,05$). A suplementação com HMB aumentou a expressão da I κ B em 2,3 vezes ($p < 0,05$ vs. SW). A atividade física promoveu o mesmo efeito da suplementação com HMB ($p < 0,05$ vs SW). A associação da atividade física e suplementação com HMB tiveram efeito aditivo sobre a expressão da I κ B, elevando para 3,3 vezes quando comparada à do SW ($p < 0,001$) e em 1,4 vezes quando comparada à dos SHW e EXW ($p < 0,05$). Quanto ao fator de indução de proteólise (PIF), a suplementação com HMB não modificou sua expressão ($p > 0,05$ vs. SW). A atividade física foi hábil em reduzir a expressão do PIF em 1,84 vezes quando comparada à dos grupos SW e SHW ($p < 0,05$). A associação da atividade física e suplementação com HMB foi hábil em reduzir para 2,75 vezes ($p < 0,001$ vs. SW e SHW). Quando comparado com a atividade física houve redução de 1,5 vezes ($p < 0,05$ vs. EXW). Estes resultados sugerem que a associação da suplementação com HMB e exercício físico contra-resistido reduz a massa tumoral e nos mecanismos envolvidos estão a redução na expressão de proteínas envolvidas no processo de proliferação celular, tais como a subunidade p65 do fator de transcrição NF- κ B e incremento da expressão da proteína inibitória deste fator (I κ B), aumento da expressão da proteína pró-apoptótica Bax e diminuição da anti-apoptótica Bcl-2 nos grupos exercitados, o que sinaliza para um aumento no balanço pró-apoptótico do tecido tumoral. A proteína PIF, importante fator relacionado com a instalação do quadro caquético, também mostrou ter sua expressão diminuída nos grupos exercitados.

Palavras Chave: Exercício, β -hidróxi- β -metilbutirato (HMB), Câncer, Apoptose, NF- κ B, Bcl-2, Fator de indução de proteólise (PIF).

ABSTRACT

Many studies have shown that leucine supplementation or with β -hidroxi- β -methylbutyrate (HMB) increases immune response. In addition, HMB is able to reduce cachexia in cancer patients. Moderate physical activity also has been shown be able to reduce hypercatabolism in cancer patients. The main goal of this study is to investigate the effect of the association of HMB supplementation and physical activity in Walker 256 tumor-bearing rats. Rats 70 days old were HMB supplemented (76 mg/kg/day) by gavage and trained during 8 weeks. Jump training consisted by ten sets of 10 jumps in water tank in 30 seconds, with an overload attached to the body equals to 50% of the body mass, followed by 1 minute o resting, four times per week. At the seventh week of training were inoculated in some rats a suspension of Walker tumor cels (3×10^7 /ml) getting the groups: tumor-bearing (SW), tumor-bearing HMB supplemented (SHW), exercised (EXW) and exercised supplemented (EXHW). After 2 weeks the rats were killed and the tumor removed and the were isolated for study of cellular proliferation by (2 - 14 C)-thymidine incorporation into DNA, apoptosis using anexin-V measurent by flow cytometer, Bcl-2, Bax, NF κ B subunits p65, p52 and κ B and finally proteolysis inducing factor (PIF) by western blotting. Tumor weight in the EXW and EXHW was lower when compared to the other groups ($p < 0.05$). Proliferation rate was also lower in these groups and there was additive effect of training and supplementation ($p < 0.05$). Apoptosis rate was higher in the EXW group ($p < 0.05$ vs. SW). Bcl-2 expression did not change by HMB but the exercise caused a reduction by 40.5% in the EXW ($P < 0.05$ vs. SW and SHW). The association between exercise and HMB supplementation caused further reduction by 58.5% ($p < 0.01$ vs. SW e SHW). Physical activity increased Bax expression by 1.7-fold ($p < 0.05$ vs. SW) but was not different from SHW ($p > 0.05$). Physical activity and supplementation increased Bax expression by 2.5-fold and 1.7-fold when compared to SW and SHW, respectively ($p < 0.05$). HMB supplementation reduced p65 expression by 1.5-fold ($p < 0,05$ vs. SW) and the physical activity by 1.75-fold ($p < 0.01$ vs. SW). The association of both procedures reduced by 6-fold, 4-fold and 3.4-fold when compared to SW ($p < 0.001$), SHW ($p < 0.05$) and EXW ($p < 0.05$), respectively. P52 expression did not change between the groups. HMB increases I κ B expression by 2.3-fold ($p < 0,05$ vs. SW), as well as the physical activity ($p < 0.05$ vs SW). Physical activity plus HMB increased I κ b expression by 3.3-fold when compared to SW ($p < 0.001$) and by 1.4-fold to SHW e EXW ($p < 0.05$). PIF expression was reduced in the EXW group by 1.84-fold ($p < 0.05$ vs. SW e SHW). The association with HMB caused further reduction by 2.75-fold ($p < 0.001$ vs. SW e SHW). Our data suggest that HMB supplementation associated to physical exercise reduced tumor growth which was accompanied by the reduction of p65 subunit of NF- κ B expression and increase of I κ B. Also, there was an increase of Bax and reduction of Bcl-2 expression. PIF expression was reduced in the exercised groups.

Keywords: Exercise, β -hidroxi- β -methylbutyrate (HMB), Cancer, Apoptosis, NF- κ B, Bcl-2, Proteolysis induction factor (PIF).

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – Câncer

O câncer é caracterizado por crescimento autônomo, desordenado e não controlado de células, que ao alcançarem certa massa, comprimem, invadem e destroem os tecidos vizinhos. Este processo é resultado de séries de alterações nos genes que controlam o crescimento e o comportamento celular. O desenvolvimento tumoral é um processo complexo que envolve múltiplos estágios: iniciação, promoção, progressão e disseminação. Cada etapa pode ser influenciada por fatores ambientais, que atuam como ativadores ou inibidores do processo. A etiologia do câncer ainda não está bem estabelecida, sendo que não se conhece a(s) causa(s) de 85 a 90% dos cânceres humanos. Porém, diversos fatores estão envolvidos na carcinogênese, sendo os principais o fumo, infecções e carcinógenos presentes na dieta alimentar (ALBERTS et al., 2002; CURI et al., 2002).

No Brasil, de acordo com o relatório de 2006 do Instituto Nacional do Câncer (INCA), foram estimados, 472.050 casos de câncer, sendo o mais comum o câncer de pele (não melanoma), seguido pelo câncer de mama, próstata, pulmão e estômago. O câncer é uma das maiores causas de mortalidade no Brasil, levando, aproximadamente, 122,600 indivíduos à morte no ano de 2002.

De vinte a setenta por cento dos portadores de tumor podem desenvolver quadro de hipercatabolismo das reservas energéticas de carboidratos, lipídeos e proteínas caracterizando a síndrome da caquexia induzida pelo tumor, que acaba por debilitar o mesmo, reduzindo as perspectivas de recuperação e podendo levar ao óbito (ARGILES, 1999). Alguns tumores podem competir com o hospedeiro por nutrientes, provocando diferentes manifestações clínicas, as mais comuns são: astenia, anorexia, perda de peso, saciedade prematura e anemia (THEOLOGIDES, 1979). Assim, o desenvolvimento tumoral pode induzir a debilidade do organismo hospedeiro,

denominada síndrome da caquexia (THEOLOGIDES, 1979; MacDONALD et al., 2003).

1.2 – Caquexia

Talvez a manifestação mais comum em doenças malignas avançadas é o desenvolvimento da caquexia. De fato, a caquexia ocorre na maioria dos pacientes com câncer antes de levá-los a óbito e é responsável por 22% das mortes (ARGILÉS et al., 2005). A caquexia caracteriza-se por estado debilitante onde ocorre perda involuntária de peso, desencadeada por desbalanço metabólico no indivíduo portador de tumor (TISDALE, 1997; ARGILÉS et al., 1999). No geral, indivíduos com tumores sólidos apresentam caquexia com maior frequência, sendo mais comum em indivíduos muito jovens ou velhos, tornando-se mais pronunciada com o progredir da doença (BRUERA, 1997). Dentre as alterações metabólicas, o hipercatabolismo tem papel importante na caquexia, sendo que portadores de tumor mostram um gasto energético aumentado aliado a uma diminuição na ingestão alimentar. Um dos fatores relacionados a estes desequilíbrios é a observação de altas taxas de consumo de glicose, pela via anaeróbia, apresentada pela maioria dos tumores de crescimento rápido (ARGILÉS et al., 1997). O lactato é então convertido em glicose no fígado do hospedeiro na tentativa de manutenção da concentração sérica deste substrato. Assim, o tumor torna-se o maior consumidor de glicose, enquanto o portador é estimulado a fabricá-la. Este mecanismo conhecido como ciclo de Cori (Figura 1), encontra-se aumentado e pode representar um considerável prejuízo energético para o portador de tumor. A utilização gliconeogênica do lactato produzido pelo tumor é um processo metabólico muito ineficiente, sendo gasto 06 moléculas de ATP para cada ciclo, porém este processo é essencial para compensar a acidose tumoral (ARGILÉS et al., 2005).

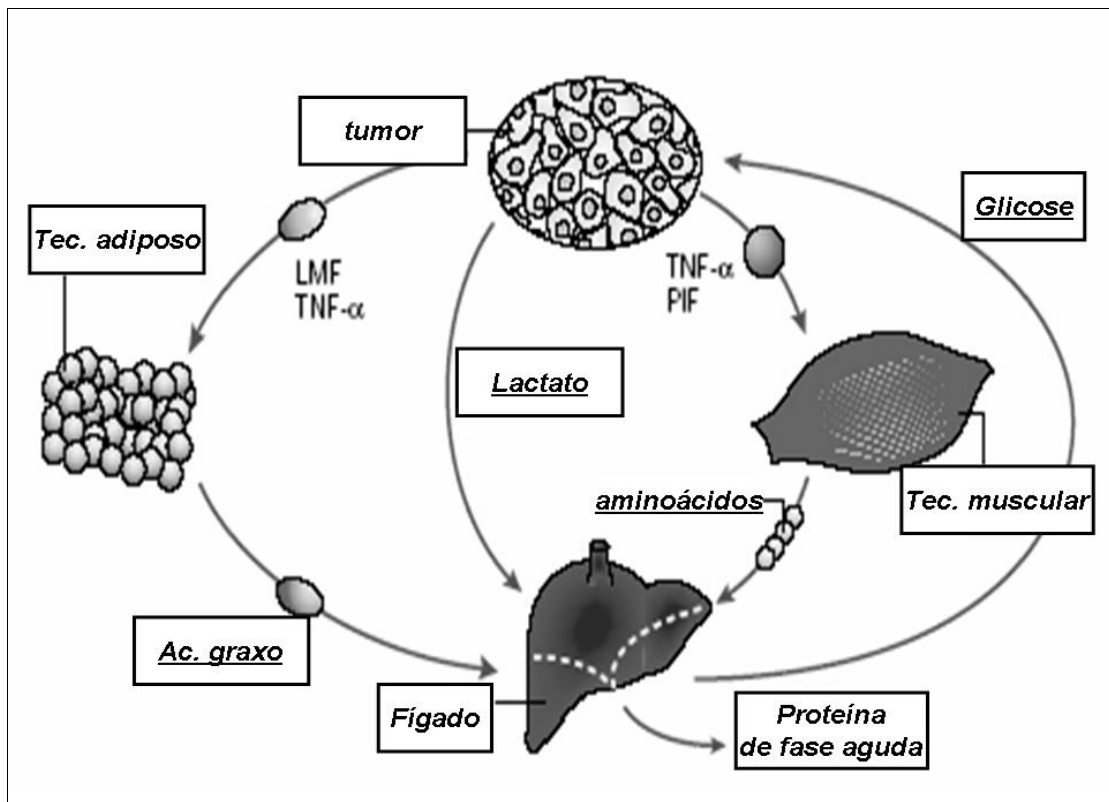


Figura 1: Esquema representativo do Ciclo de Cori. A glicose é convertida em lactato ao invés de CO_2 devido aos baixos níveis de oxigênio que não permite que ocorra o Ciclo de Krebs. O lactato é transferido para o fígado, onde é utilizado para a síntese de glicose (gliconeogênese). Este ciclo é responsável por um acréscimo de 300 Kcal por dia no organismo caquético. (Adaptado Tisdale M.J., 2002).

Observa-se, na síndrome da caquexia induzida pelo tumor, intenso catabolismo protéico dos músculos esqueléticos, os quais detêm praticamente a metade da massa protéica corpórea (TISDALE, 1997; MAY et al., 2002). Fisiologicamente, durante o jejum, aminoácidos são mobilizados do músculo esquelético para o fígado, sendo substratos para a gliconeogênese. A redução muito prolongada da ingestão alimentar leva a diminuição da degradação das proteínas musculares, evitando desequilíbrio de nitrogênio e depleção muscular. Esse mecanismo de conservação de nitrogênio está ausente em indivíduos portadores de câncer que desenvolvem caquexia, produzindo balanço negativo de nitrogênio, cujos fatores responsáveis não são completamente conhecidos (ARGILÉS et al., 1997).

A perda completa da gordura corporal é uma característica típica da caquexia. O aumento da quebra de gordura resulta em liberação de glicerol (substrato para a gliconeogênese) e ácidos graxos que podem ser oxidados promovendo energia para a via gliconeogênica. Estas mudanças são basicamente devido à queda na atividade da lipase lipoprotéica (LPL) e aumento na atividade da lipase hormônio sensível (HSL). Juntamente a tudo isto há inibição do transporte de glicose para os tecidos e da capacidade de síntese “de novo” de ácido graxo, devido a menor atividade de enzimas chave do processo, como por exemplo, a 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 et al., 2004; ARGILÉS et al., 1997; FERNANDES et al., 1991; FERNANDES et al., 1990). Assim, o combate aos efeitos danosos da caquexia induzida pelo tumor requer terapia alternativa, as quais objetivam antagonizar essas alterações metabólicas (TISDALE, 1997).

1.3 – Anorexia

Anorexia é a perda do apetite e rápida saciedade encontrando-se presente em aproximadamente metade dos pacientes com câncer. A isto se soma o decréscimo nas sensações de paladar e olfato. (TISDALE, 2001).

Muitos estimuladores de apetite têm sido testados no tratamento de pacientes com câncer que desenvolvem a anorexia. Corticosteróides tem mostrado efeito temporário em relação ao apetite, ingestão alimentar, sensação de bem-estar que se limitam a algumas semanas. Entretanto não mostram nenhum efeito em relação ao peso corporal. Progestágenos, como o acetato de megestrol e o de medróxiprogesterona, fazem parte da abordagem atual no tratamento da perda de peso em pacientes com caquexia. Salvo suas limitações, eles podem agir no “downregulation” de citocinas pró-inflamatórias, que têm ação anorexígena (TISDALE, 2005).

Os progestágenos parecem estimular o apetite através da produção de peptídeos orexígenos como, por exemplo, o neuropeptídeo Y (NYP), que ocorre na porção ventromedial do hipotálamo e também parece agir diminuindo a síntese e liberação de citocinas pró-inflamatórias. O aumento da atividade de neurônios produtores de NPY é importante porque acarreta a diminuição da síntese de leptina e insulina como é visto em modelos de animais caquéticos.

A anorexia, em animais portadores de tumor, pode ser causada por disfunção no sistema adenilato ciclase nas membranas das células hipotalâmicas (CHANCE et al., 1996), pois a injeção intrahipotalâmica de neuropeptídeo-Y, potente estimulador da sensação de fome (KING; WILLIAMS, 1998), não estimula muito a ingestão alimentar, nestes animais, quando comparados aos controles sem tumor (CHANCE et al., 1996). Esta observação sugere que o sistema de sinalização pós-sináptica, via neuropeptídeo-Y, está alterado em ratos portadores de tumor. Somado a isto, a quantidade ou a liberação de neuropeptídeo-Y pelos núcleos paraventriculares e hipotálamo, também está diminuída nestes animais (CHANCE et al., 1994). Em adição, citocinas tais como fator de necrose tumoral (TNF), interleucina-1 (IL-1) e interleucina-6 (IL-6) podem estar envolvidas na anorexia (DUNLOP; CAMPBELL, 2000), pois interagem com os centros controladores da fome no hipotálamo, estimulando a liberação de substâncias supressoras de apetite e

diminuindo a liberação de estimuladores, como o neuropeptídeo-Y. A infusão de IL-1, em ratos sem tumor, causa mudanças na ingestão alimentar, no número de refeições e tamanho das refeições similares às aquelas observadas na anorexia causada pelo câncer (LAVIANO et al., 1996). Em ratos, a inibição da produção da prostaglandina-E₂ (PGE₂) pela administração de ibuprofeno, bloqueia totalmente o efeito anoréxico da IL-1 (HELLERSTEIN et al., 1989). Citocinas, tais como a IL-1 e o TNF, estão envolvidas no desenvolvimento da anorexia relacionada ao câncer, possivelmente pelo incremento das concentrações do hormônio liberador de corticotropina (CRH), que é capaz de suprimir a ingestão alimentar (WATANOBE; TAKEBE, 1992, ARGILES et al., 2005). Também se postula que a anorexia contribua para a perda de tecido muscular esquelético, mas outras alterações como as do metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas parecem ter participação muito maior (TISDALE, 2001).

1.4 Alterações Energéticas

A fonte principal de energia para tumores sólidos é a glicose, a qual é convertida em lactato ao invés de CO₂ e H₂O. Isto acontece não por disfunção mitocondrial, mas pela baixa tensão de oxigênio que dificulta a utilização do ciclo de Krebs e a fosforilação oxidativa. O lactato produzido é transportado via sangue para o fígado, onde é usado para sintetizar novas moléculas de glicose, processo conhecido como ciclo de Cori. Este ciclo promove um gasto energético adicional de aproximadamente 300 kcal por dia em pacientes com câncer. Tanto o glicerol, liberado do tecido adiposo devido ao aumento da lipólise, quanto os aminoácidos, liberados dos músculos esqueléticos devido à aumentada proteólise, são substratos gliconeogênicos importantes, sendo o último sendo também usado para a síntese de Proteínas de Fase Aguda (TISDALE, 2002).

1.5 Alterações do metabolismo do tecido adiposo

Pacientes com câncer exibem alto “turnover” de glicerol e ácidos graxos, e a elevada taxa de mobilização de lipídeos é geralmente evidente antes de se estabelecer a perda de peso. Nestes sujeitos, os ácidos graxos liberados na corrente sanguínea são rapidamente oxidados e ocorre aumento de 20% na sua oxidação. Existem evidências de que a mobilização de ácidos graxos aconteça devido à atividade aumentada de receptores β -adrenérgicos. Isto foi demonstrado pela administração oral de bloqueadores destes receptores que levaram a diminuição do gasto energético em repouso, da captação de oxigênio e produção de CO_2 em pacientes com câncer que apresentavam perda de peso (DROTT et al., 1989). Citocinas como o TNF, IL-6, IL-1 e INF- α e INF- γ e o Fator Inibitório de Leucemia (LIF) são capazes de inibir a Lipoproteína lipase (LPL), a qual exerce papel central na lipogênese no tecido adiposo (BERG et al. 1994). Além disso, TNF- α também promove diretamente a lipólise em adipócitos de humanos ativando as vias de MEK e ERK e pela elevação de AMPc através da adenilato ciclase via adrenoceptor β -3.

O Fator Mobilizador de Lipídeos (LMF), glicoproteína de 43kDa foi primeiramente demonstrada estar presente na urina de pacientes com caquexia e tem a capacidade de estimular diretamente a lipólise. Esta proteína interage com receptor β 3-adrenérgico promovendo aumento de AMPc levando a uma ativação da Lipase Hormônio-sensível (HSL) (Figura 2). Não existem evidências de aumento nas concentrações de Lipoproteína Lipase (LPL) no tecido adiposo de pacientes com câncer, porém ocorre aumento de duas vezes nas concentrações de mRNA para HSL, o que sugere aumento na hidrólise de triacilgliceróis.

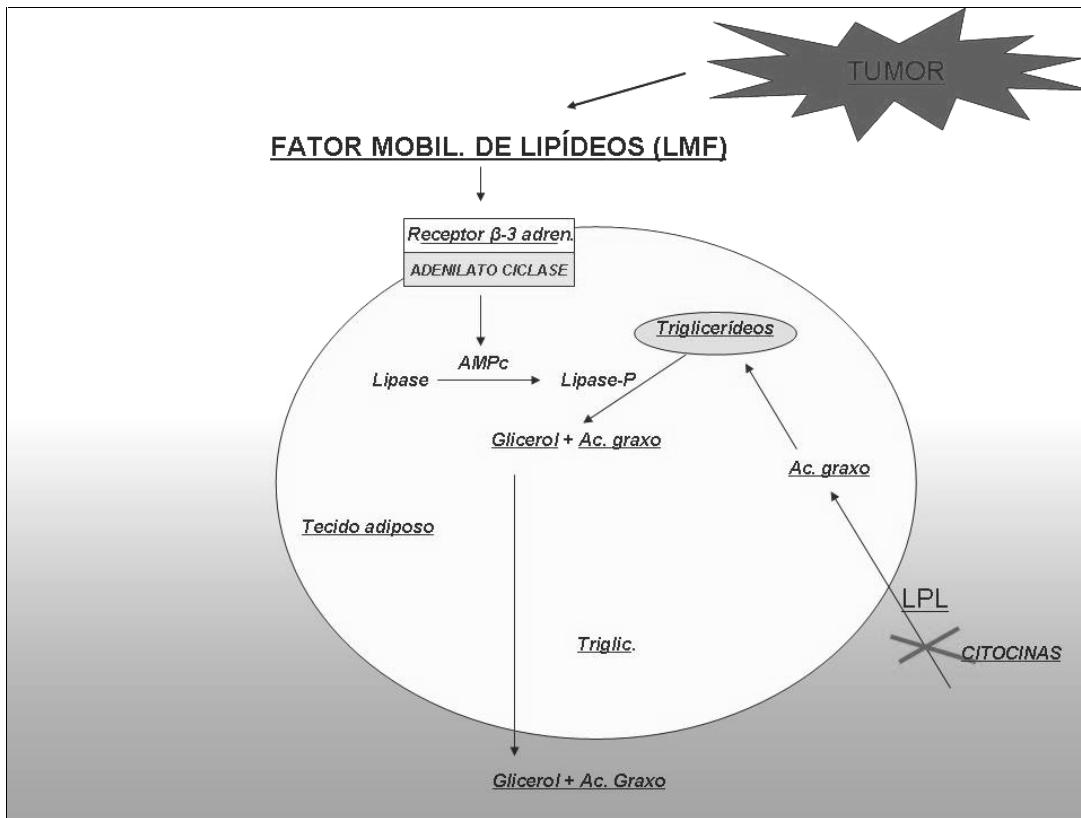


Figura 2: Síntese e Degradação de Ácidos Graxos no Tecido Adiposo na presença de tumor.

1.6 Alterações do metabolismo do tecido muscular

A massa muscular caracteriza-se por um balanço entre a taxa de síntese protéica e a taxa de degradação. Pacientes com perda de peso induzida pela presença de tumor mostram queda acentuada na síntese de proteína muscular e elevação na degradação protéica que é dada pelo aumento na expressão da via proteolítica Ubiquitina-proteossoma ATP dependente. Portanto, o músculo esquelético de pacientes com câncer têm aumento na expressão de mRNA para as subunidades do proteossoma e ubiquitina em paralelo com a hiperatividade deste sistema.

Contribuindo para o processo de perda de massa muscular, está o aumento na síntese de proteínas de fase aguda (APC) no fígado que altera o balanço de aminoácidos para síntese protéica muscular, juntamente com

decréscimo na concentração plasmática de aminoácidos de cadeia ramificada, de fundamental importância para manutenção da massa muscular corporal.

Alguns indivíduos portadores de tumor podem apresentar resistência periférica à insulina (TAYEK, 1992), ou ainda diminuição na produção de insulina. Isto geralmente vem acompanhado de aumento dos hormônios contra-reguladores catabólicos como: catecolaminas, cortisol e glucagon (COSTELLI et al. 1999; BARACOS, 2001). Essa situação pode alterar o estado energético do músculo e, concentrações reduzidas de ATP e Creatina-fosfato podem diminuir a síntese protéica (KIMBALL et al., 2002). A diminuição da síntese protéica pode ser resultante de redução da concentração de insulina plasmática, da resistência à insulina pelo músculo, pela redução nos níveis de tradução, diminuição do aporte de aminoácidos ou no balanço de aminoácidos necessários para o processo. Em pacientes que desenvolvem a caquexia, um dos fatores determinantes na diminuição de síntese protéica e por consequência da perda de massa muscular, é a diminuição da atividade física. Outro fator é o aumento da síntese de proteínas de fase aguda (APP) pelo fígado, que pode limitar a disponibilidade de certos aminoácidos para a síntese de proteínas no músculo esquelético (TISDADE, 2002).

Existem três principais vias proteolíticas responsáveis pela lise protéica no tecido muscular esquelético. Uma é o sistema lisossomal, envolvido na catálise de proteínas extracelulares e de receptores de superfície celular; outra via é pelas calpaínas citoplasmáticas reguladas por cálcio, que estão envolvidas no processo de dano tecidual, necrose e autólise; e finalmente o sistema proteolítico ubiquitina-proteossoma ATP dependente. Dos três mecanismos, o último é considerado o mais importante para degradação protéica em várias condições metabólicas, incluindo a caquexia no câncer. Nenhuma das outras duas vias é capaz de degradar proteínas miofibrilares, embora possam estar envolvidas em mecanismos que auxiliam no processo (WHITEHOUSE et al., 2001).

O mecanismo pelo qual esta via ocorre, inicia-se pela ligação de várias Ubiquitinas (peptídeo formado por 76 aminoácidos) à proteína alvo, formando uma cadeia poliubiquitina. A função de ligação destes peptídeos ao alvo de degradação é de responsabilidade de um conjunto de três enzimas denominadas E1, E2 e E3, cuja função vai desde a ativação da Ubiquitina (E1),

captação da Ubiquitina ativada e entrega desta para a proteína ligada com E3 (E2), e reconhecimento da proteína marcada para ser degradada e ligação do peptídeo a proteína alvo (E3). Esta cadeia polipeptídica tem como papel marcar a proteína para que possa ser degradada pelo proteossoma 26S, que é um complexo proteolítico com múltiplas subunidades. Dentre as subunidades que o compõe estão a porção catalítica central (20S) juntamente com 02 complexos regulatórios terminais um em cada extremidade (19S) e juntos formam o Proteossoma 26S (ADAMS, 2004). (Figura 3).

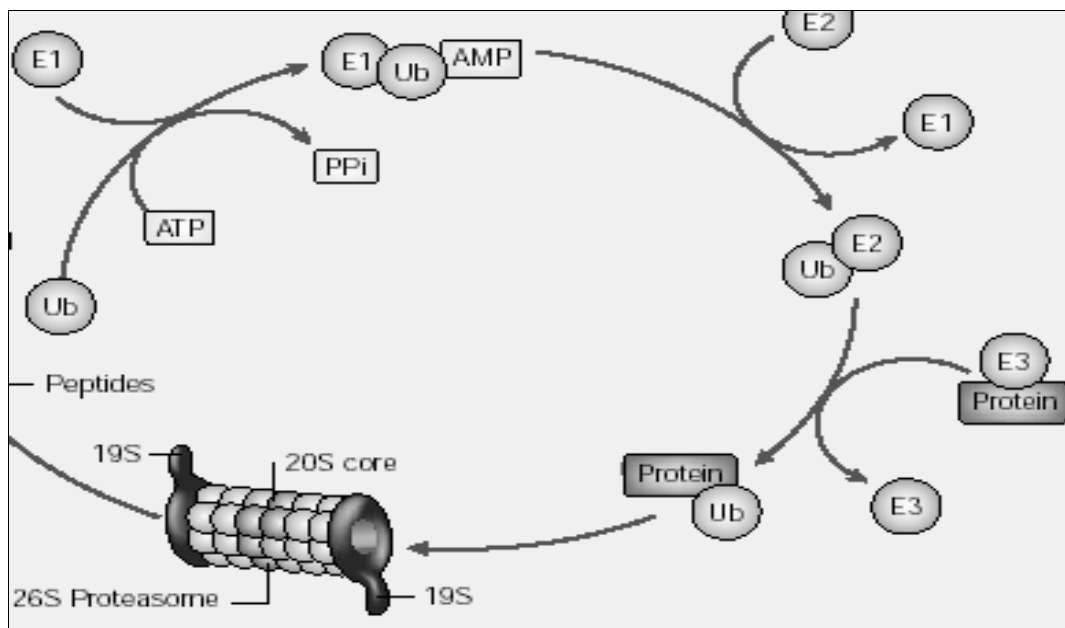


Figura 3: Sistema Proteolítico Ubiquitina-proteossoma ATP dependente. (Adaptado TISDALE, M.J., 2005)

1.7 Fatores envolvidos no catabolismo tecidual no câncer.

Vários fatores produzidos pelo tumor ou pelos tecidos do hospedeiro na presença do tumor têm papel no mecanismo de perda tecidual na caquexia. Dentre estes fatores encontram-se algumas citocinas, tais como TNF, IL-1, IL-6 e Interferon-gama que podem ser produzidos pelo tumor e também pelos

tecidos do hospedeiro e o Fator indutor de proteólise (PIF) e o Fator mobilizador de lipídeos (LMF) previamente mencionado.

1.7.1 Citocinas

Alguns fatores produzidos pelos tumores ou pelo hospedeiro na presença do tumor podem ter papel importante na perda tecidual que ocorre na caquexia. A caquexia tem semelhanças com processos de dano tecidual, infecções e inflamação em se tratando da síntese de proteínas de fase aguda (APP) pelo fígado. Quando o quadro de caquexia se instala, o fígado que até então promovia principalmente a síntese de albumina, passa a sintetizar primariamente proteínas de fase aguda, em particular o, fibrinogênio, proteína C reativa (CRP) e 1-antitripsina.

MCMILLAN et al. (1998) mostraram que em tumores de pulmão e gastrintestinais as altas concentrações de proteína C reativa estavam associadas com a taxa de perda de massa corpórea. As proteínas de fase aguda são conhecidas por serem ativadas pelas citocinas IL-6, IL-8 e TNF, sugerindo que estas exercem papel no quadro caquético. TISDALE et al. (2005) aventam os possíveis mecanismos pelos quais as citocinas promovam o catabolismo tecidual. No tecido adiposo foi originalmente proposto que todas as citocinas promovem inibição da Lipoproteína Lípase (LPL), embora em diferentes intensidades. Isto seria um mecanismo pelo qual as citocinas induziriam a perda de tecido adiposo pela inibição da ressíntese de triacilgliceróis. Entretanto, a inibição da LPL não parece exercer tamanha alteração nos estoques de gorduras, visto que em pacientes com hiperlipidemia tipo I, causada por deficiência na LPL, o tecido adiposo mostra-se normal e não há presença de caquexia. Além disso, em pacientes com câncer, não existem evidências de que haja inibição de LPL no tecido adiposo. Algumas citocinas, como o TNF tem mostrado estimular a lipólise *in vitro*, embora para isso fosse necessária incubação prolongada (12-24h). TNF também promoveu termogênese em ratos, possivelmente devido à aumentada expressão de UCP2 e UCP3 (proteínas desacopladoras) promovendo um mecanismo auxiliar na lipólise de ácidos graxos mobilizados (BUSQUETS et al., 1998).

No músculo esquelético, TSUJINAKA et al. (1996) mostraram que a atrofia muscular associada com concentrações aumentadas de mRNA para catepsinas (B e L) e ubiquitinas é observada em ratos transgênicos para IL-6. Este efeito é completamente bloqueado quando na presença de anticorpos anti-receptores de IL-6. COSTELLI et al. (2002) trataram ratos portadores de hepatoma de Yoshida AH-130 com pentoxifilina, inibidor da síntese de TNF, ou com sumarina, que bloqueia a ação periférica de algumas citocinas dentre elas, TNF, e IL-6, mostraram ocorrer prevenção da perda de massa muscular e significativa redução da proteólise por calpaínas e proteossoma.

Em estudo realizado por GARCIA-MARTINEZ et al. (1993) o tratamento agudo de ratos com TNF causou aumento na proteólise e diminuição da síntese protéica no músculo sóleo, enquanto que nos extensores longos dos dedos não houve nenhum efeito. Da mesma forma, alguns estudos mostraram que IL-6 não têm efeito direto sobre o balanço protéico quando administrado em camundongos.

Por algum tempo, houve dificuldade em demonstrar um efeito direto das citocinas na degradação protéica. Entretanto, TNF tem mostrado produzir aumento na expressão do gene para ubiquitina após a incubação com músculos sóleo e também induzir a perda de proteína miofibrilar mediada por proteossoma em miócitos e este processo ocorre com envolvimento do fator de transcrição nuclear NF- κ B.

1.7.2 PIF

Fator indutor de proteólise (*Proteolysis Inducing Factor*-PIF) é uma glicoproteína sulfatada de 24 kDa com núcleo protéico e extensivas glicosilações em resíduos de asparagina e serina. O efeito biológico do PIF é devido a cadeias oligossacarídicas sulfatadas sendo que o núcleo protéico não é capaz de promover degradação protéica no músculo esquelético. Músculos esqueléticos na presença desta proteína mostram aumento na atividade e expressão de componentes chaves da via proteolítica Proteossoma-ubiquitina ATP dependente (LORITE et al., 2001). A indução do sistema Proteossoma-Ubiquitina pelo PIF, parece, assim como o TNF, estar ligada com a degradação da proteína inibitória do fator de transcrição nuclear κ B o I κ B, o que leva à

migração nuclear deste fator acarretando transcrição gênica de componentes do sistema proteolítico em questão. No fígado o PIF promove a ativação dos fatores de transcrição NF- κ B e STAT3. Isto leva ao aumento da produção de IL-6 e IL-8 e conseqüente aumento da síntese de Proteína C reativa e redução na síntese de transferrina. Embora tenham diferentes composições e origens, tanto PIF quanto as citocinas parecem ativar via de sinalização em comum, levando a ativação de NF- κ B.

As citocinas envolvidas na caquexia parecem diferir do tumor para tumor e, além disso, não tem ação sozinha (TISDALE, 2005). Portanto, é possível que produtos tumorais que induzam ao catabolismo promovam uma mudança na produção de citocinas e isto contribua para o desenvolvimento da caquexia (TISDALE, 2003).

1.8 NF- κ B

É um fator de transcrição, evolutivamente conservado, com papel importante na resposta a mudanças ambientais e também envolvido em vários processos biológicos. A família de fatores de transcrição NF κ B contém 5 membros (Figura 4): NF- κ B1 (p105 e p50), NF- κ B2 (p100 e p52), RelA (p65), RelB e c-Rel. Estas proteínas têm em comum um domínio homólogo Rel (*Rel homology domain*) que promove ligação ao DNA, dimerização e interação com fatores de inibição específicos, os chamados I κ B, que fazem com que os dímeros de NF- κ B permaneçam no citoplasma.

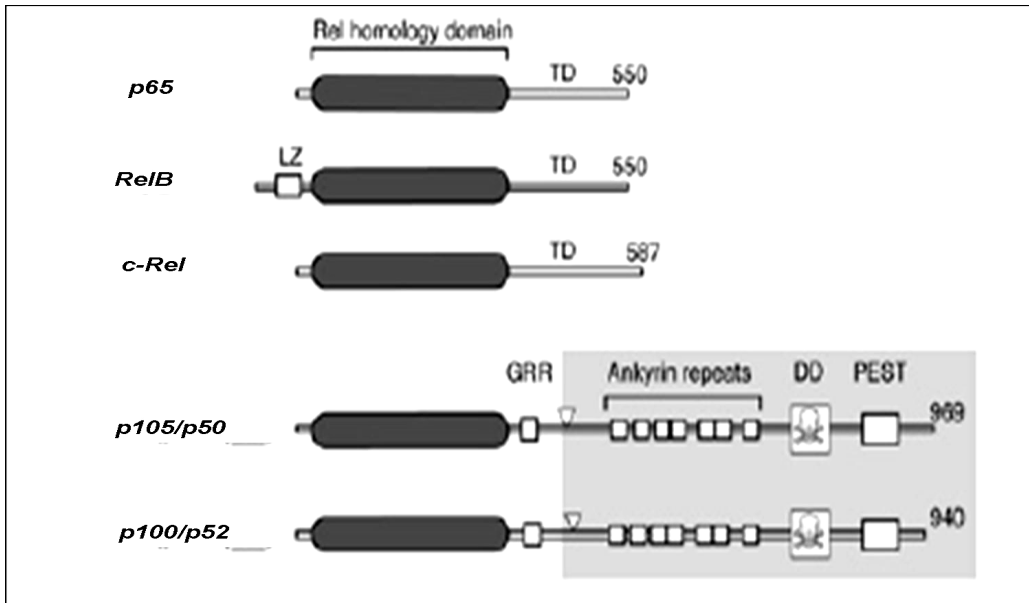


Figura 4: membros da família NF-κB de fatores de transcrição.

Muitos estímulos são capazes de ativar o NF-κB, principalmente através da ativação da quinase IKK responsável por promover a fosforilação de IκB e sua posterior degradação no Proteossoma. O NF-κB, uma vez, liberado segue para o núcleo onde regula a transcrição de diversos genes para citocinas, fatores de crescimento, moléculas de adesão celular e proteínas pró e anti-apoptóticas. (ESCÁRCEGA et al. 2007). O NF-κB é conhecido por inibir a apoptose através da indução de proteínas anti-apoptóticas e/ou supressão de genes pró-apoptóticos. A ativação constitutiva de NF-κB, observada em muitos tumores malignos, protege as células de estímulos apoptóticos, incluindo os tratamentos anti-câncer. Ativação constitutiva de NF-κB pode ser observada em diversos tipos de tumores linfóides e mielóides. Além destes, tumores sólidos, dentre os quais os de mama, glioblastoma e muitos outros, são também caracterizados pela ação nuclear contínua e constitutiva deste fator de transcrição. Atividade constitutiva pode estar ligada a rearranjos genéticos que levam a expressão aberrante de NF-κB, a mutações da proteína inibitória IκB ou ainda, a atividade aumentada de IKK (Figura 5).

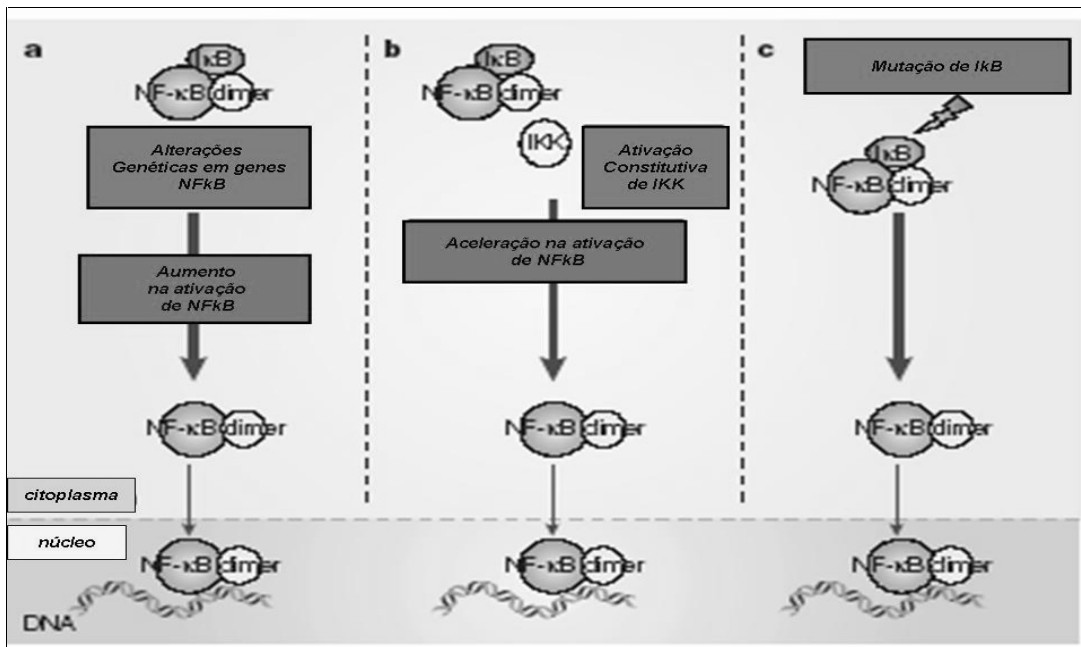


Figura 5: Ativação de NF-κB, em células tumorais (a), ativação constitutiva de IKK (b) e mutação de IκB (c).

Ainda, demonstrações genéticas da função oncogênica de NF-κB foram obtidas a partir de estudos em modelos animais demonstrando que o desenvolvimento do câncer secundariamente a inflamações era dependente da atividade de IKK e ativação de NF-κB (OLIVIER et al., 2006).

1.9 PIF, NFκB e câncer

Mudanças na taxa de síntese e degradação protéica na caquexia provavelmente provêm da presença de fatores tumorais, tais como o Fator de indução de proteólise (PIF). O PIF é produzido somente por tumores que induzem à caquexia e quando purificado e inoculado em ratos promove perda de massa muscular esquelética em específico, enquanto a quantidade de proteína visceral é mantida ou até mesmo aumentada (LORITE et al. 1998).

A proteólise aumentada causada pela presença do PIF é acompanhada por um aumento da liberação de ácido araquidônico da membrana com subsequente metabolismo em ácido 15-hidroxi-eicosatetraenóico (15-HETE), o qual mostra relação com a catálise protéica. Tanto o ácido araquidônico quanto os metabólitos provenientes das lipoxigenases ativam a proteína quinase C (PKC) que participa na expressão de subunidades do proteossoma. A PKC promove a fosforilação do complexo proteico IKK, que por sua vez fosforila a proteína inibitória do fator de transcrição NF-κB, a IκB. Dessa forma o NF-κB torna-se livre para adentrar o núcleo e participar da transcrição gênica de elementos do proteossoma enquanto IκB é degradada no proteossoma. (WHITEHOUSE; TISDALE, 2003) (Figura 6).

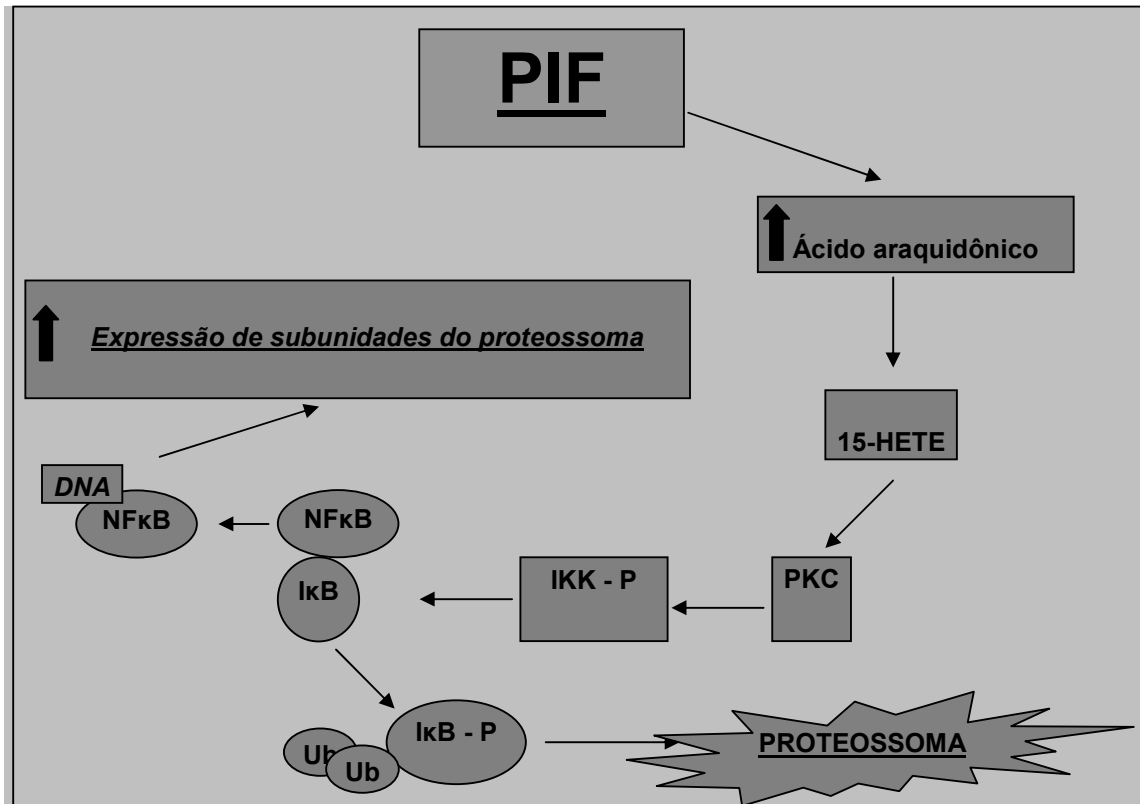


Figura 6: Mecanismo de ação do Fator indutor de proteólise (PIF) no mecanismo proteolítico envolvido na caquexia. PIF, fator de indução de proteólise, 15-HETE ácido 15-hidróxieicosatetraenóico, PKC proteína quinase C, IKK-P quinase do Ikb fosforilada, Ikb proteína inibitória de NF-kB, NF-kB fator de transcrição nuclear kB, Ub ubiquitina.

1.10 ERK e Tumorigênese

Tipicamente, receptores de superfície celular em especial os com atividade tirosina-quinase (RTK) e os ligados à proteína G, transmitem sinais de ativação para a cascata Raf/MEK/ERK. O mecanismo de ativação de Raf depende da ligação da proteína Ras à membrana como também de eventos de múltipla fosforilação. A regulação de Ras e de Raf é tão crucial para a manutenção da proliferação celular que mutações nos mecanismos de ativação dos respectivos genes levam à oncogênese (CHONG et al., 2003). Uma vez ativada Raf se liga e fosforila as quinases MEK-1 e MEK-2, que por sua vez fosforilam ERK1/2. As alterações genéticas mais freqüentes detectadas no câncer é na família de oncogenes *ras*, que têm papel no controle do

crescimento tanto de células normais quanto tumorais. A ativação constitutiva da via da ERK acontece com frequência em tumores humanos e é geralmente devido à super-expressão ou mutação de receptores a montante da ERK com função tirosina quinase, aumento de expressão de fatores de crescimento ou ativação mutacional de Ras e de seus efetores a jusante. A principal consequência desta ativação constitutiva parece ser a promoção do crescimento tumoral, invasão, angiogênese e metástase. A sinalização através da ERK pode levar ao aumento na expressão de fatores de crescimento e citocinas pelo tumor que de forma autócrina estimula seu crescimento. A via da ERK age também na progressão do ciclo celular por induzir a expressão das ciclinas D e E, promover a fosforilação e indução da degradação do inibidor do ciclo celular (inibidor de CDK) p27^{kip}. Outro importante papel da ERK na tumorigênese é sua habilidade de regular a motilidade celular, remodelação de matriz extracelular e a produção de fatores angiogênicos como o fator de crescimento de endotélio e vasos (VEGF). Além disso, a ativação desta via pode promover resistência a drogas anticâncer por inativar a via pró-apoptótica das caspases e de BAD e também pela diminuição da expressão de p53, todas essas proteínas necessárias para o processo de resposta a erros genéticos (CHONG et al., 2003).

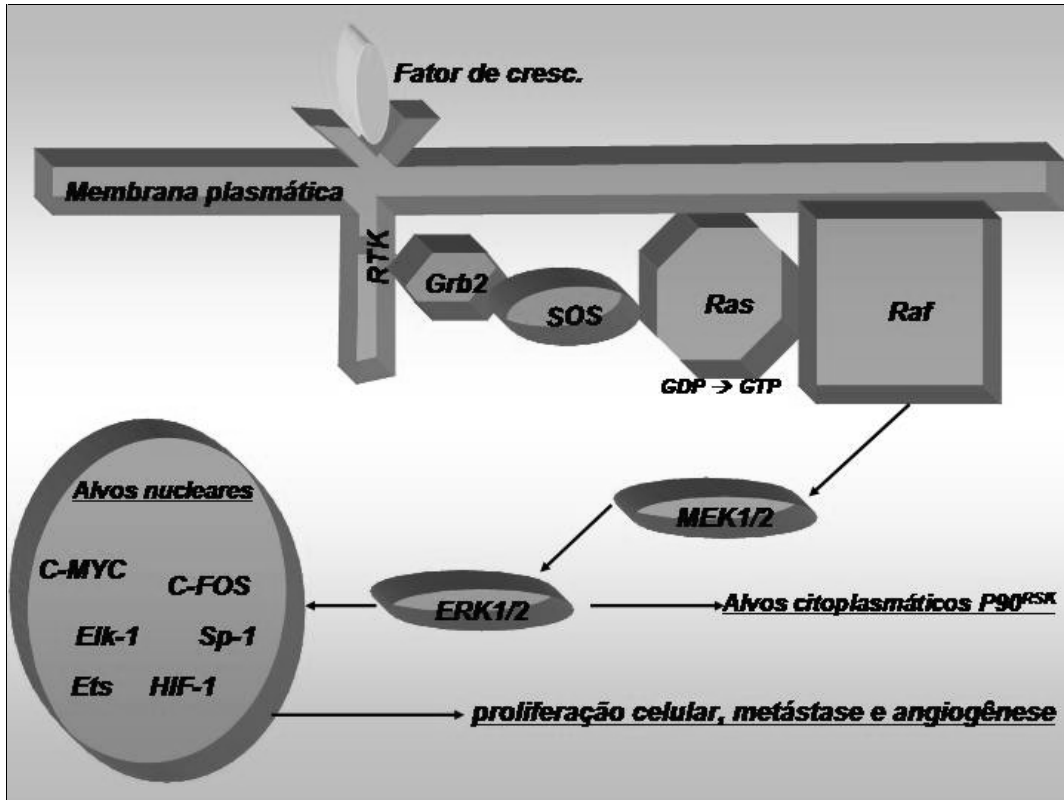


Figura 7: Via de sinalização de Ras-Raf-MEK-ERK. Eventos que seguem a ligação de um ligante ao receptor tirosina quinase (RTK). Proteína ligadora de receptor de fator de crescimento 2 (*Grb2*) representa uma molécula adaptadora; SOS um fator trocador de GTP. A ativação sequencial de Ras-Raf-MEK-ERK resulta em fosforilação tanto de fatores citoplasmáticos (p90^{RSK}:ribosomal 6 kinase) quanto nucleares (C-FOS, C-MYC, Elk-1, Ets, Sp1, e HIF-1) levando à proliferação celular, metástase, e angiogênese.

1.10.1 ERK e PIF

A via da ERK/MAPK tem mostrado ser importante na expressão de subunidades proteossomais induzidas pelo PIF (SMITH e TISDALE, 2003). Dessa forma, o PIF pode induzir a fosforilação e, por conseguinte ativação das quinases ERK1 e ERK2. A via ERK/MAPK está ligada com a proteína quinase C (PKC) por múltiplos passos. Estimulando receptores ligados à proteína G

pode-se indiretamente ativar a via MAPK através da PKC. Tem sido proposto que a PKC- α fosforila e ativa a Raf-1 quinase, proteína essa que é substrato não somente para a isoforma α da PKC mas também as demais. Esta ativação de Raf-1 leva à ativação de MAPK. Esta via de MAPK ativada pode levar à um aumento da expressão de subunidades proteossomais, portanto uma via alternativa para ativação deste sistema além do NF- κ B.

1.11 Apoptose

Apoptose é processo de morte celular programada regulado geneticamente. A célula em processo de apoptose é caracterizada por perda de seu volume celular, formação de *Blebbing* na membrana plasmática, condensação nuclear, agregação da cromatina e degradação endonucleocítica do DNA em fragmentos nucleossomais. Estas mudanças celulares ocorrem após uma cascata de sinalização celular e eventos mediados por caspases que regulam proteínas pró e anti-apoptóticas e que são disparados por dois mecanismos principais os quais tem como objetivo a ativação de caspases e quebra de substratos celulares específicos. O primeiro mecanismo é conhecido como apoptose mediada por receptores. Esta via inclui os ligantes e seus receptores tais como FAS, TNF, TRAIL, além das caspases e proteínas da família Bcl-2. O outro mecanismo envolve a mitocôndria, ativação de proteínas Bcl-2, liberação de citocromo c e a formação do apoptossomo (HU e KAVANAGH, 2003).

1.11.1 Bcl-2 e Bax

Tendo como base a forma e a função, a família Bcl-2 de proteínas é composta por três subclasses: **1)** subclasse Bcl-2 a qual representa um grupo formado por proteínas anti-apoptóticas com quatro domínios homólogos Bcl-2 (BH1-4) e dentre seus membros incluem, Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w e Mcl-1, **2)** a subclasse Bax que consiste de proteínas pró-apoptóticas formadoras de canal com três domínios BH (BH1-3) que incluem Bax, Bak, e **3)** a subclasse BH3 representada por ligantes pró-apoptóticos que contém somente o domínio BH3

que subdivide-se em proteínas ativadoras de Bax e Bak (Bim, Bid e PUMA) e inibidoras de Bcl-2 (NOXA e Bad) (ADAMS et al. 1998 , KIM et al. 2006).

Em uma célula viável os membros pró-apoptóticos da família Bcl-2 (Bax e Bak) e as proteínas BH3 ativadoras encontram-se inibidos pelas proteínas anti-apoptóticas. Este mecanismo acontece pelo fato de Bcl-2 promover o seqüestro de proteínas BH3 ativadoras de Bax e Bak (Bim, Bid e PUMA) deixando-as inativadas. Em resposta a estímulos apoptóticos, os membros BH3 inibidores da família Bcl-2 (Bad e NOXA) são ativados por aumento na transcrição, realocização subcelular, desfosforilação ou proteólise. Estas, uma vez ativadas, inibem as proteínas Bcl-2 anti-apoptóticas liberando as proteínas BH3 ativadoras (Bim, Bid, PUMA) para proverem ativação de Bax e Bak que subsequentemente se oligomerizam e se inserem na membrana mitocondrial para formar poros elas mesmas ou em associação com um complexo protéico da membrana mitocondrial interna, chamado poro de transição de permeabilidade mitocondrial. Em consequência, fatores pró-apoptóticos, como por exemplo, o citocromo C, são liberados no citosol e contribuem para a ativação das cascatas de caspases (VERMEULEN et al., 2003). Uma vez no citosol, o citocromo C liga-se ao fator de ativação de protease apoptótica 1 (Apaf-1), que se liga e ativa a pró-caspase 9, que quando ativada cliva e ativa a caspase-3 (ROTH; REED, 2002). A caspase-3, uma vez ativada garante que o processo ocorrerá até o fim (ZHANG et al., 2004) (Figura 8).

Poderia-se inferir, portanto, que os níveis de expressão de Bcl-2 e Bax são um fator determinante na apoptose, e que células que têm superexpressão de Bcl-2 poderiam escapar da apoptose pelo fato de estarem inibindo a ativação de proteínas pró-apoptóticas. Kim et al., (2006) afirma que estas duas proteínas (Bcl-2 e Bax) competem pela ligação com as proteínas BH3 ativadoras, sendo os níveis de expressão destas proteínas cruciais para determinar o destino da célula quanto à sobrevivência ou morte. A expressão aumentada de Bcl-2 e de seus homólogos anti-apoptóticos ou a inativação de Bax, não apenas promove proteção contra apoptose como também aumenta o tempo de vida da célula.

A manutenção dos mecanismos anti-apoptóticos estão relacionados com a sobrevivência celular, sendo estes, indesejáveis na presença de células que sofreram algum tipo de mutação. A perda de mecanismos que controlam a via

da apoptose predispõe ao câncer por duas razões: primeiro, a mutação de genes regulatórios da apoptose permite que células mutadas, as quais iriam normalmente ser eliminadas por apoptose, sobrevivam. Segundo, as células que continuam se multiplicando após terem adquirido resistência à apoptose também resistem e sobrevivem (FOSTER, 2007).

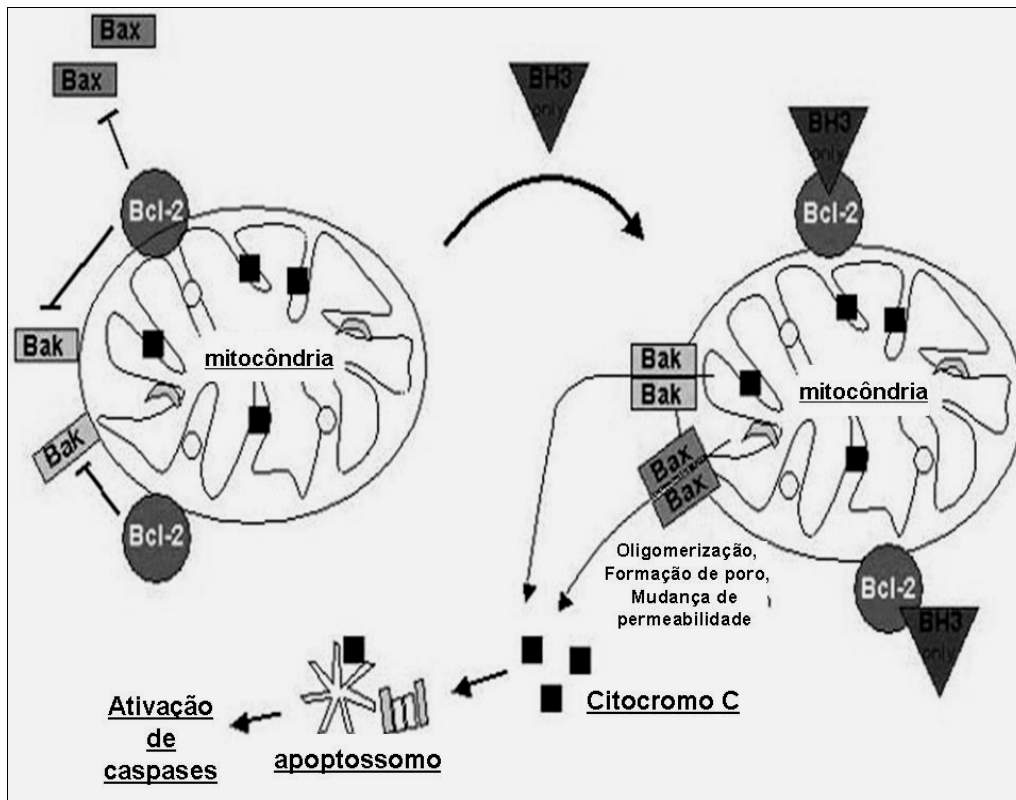


Figura 8: Regulação da apoptose pela família Bcl-2 de proteínas.

1.12 β -hidroxi- β -metilbutirato (HMB)

O HMB é um metabólito da leucina formado pela sua transaminação em α -cetoisocaproato (KIC), seguido pela oxidação deste no citosol dos hepatócitos e possivelmente em outros tecidos também, para dar origem ao HMB. O HMB é produzido a partir do KIC pela enzima KIC-dioxigenase. Esta enzima produz HMB livre no citosol e para isso requer a presença de ferro e oxigênio molecular (NISSEN et al. 1996). A dioxigenase citosólica encontra-se presente em grande quantidade, principalmente no fígado, quando comparada

com outros tecidos e acredita-se que em condições normais, aproximadamente 5% da oxidação de leucina no organismo aconteça via KIC-dioxigenase. As concentrações de HMB no plasma variam entre 1 e 4 μM , porém podem aumentar em torno de 5 a 10 vezes após a ingestão de leucina (NISSEN; ABUMRAD, 1997).

O HMB é provavelmente o responsável pelos efeitos metabólicos da leucina e seus derivados provenientes do metabolismo das proteínas. O aumento da massa muscular tem sido mostrado tanto em modelos animais quanto em humanos submetidos à suplementação com HMB. A maior evidência de alterações metabólicas induzidas pelo consumo de HMB foi mostrada por NISSEN et al. (1996), que mostrou haver uma redução de 20% na eliminação de 3-metil-histidina, importante marcador de dano muscular, na urina de indivíduos submetidos à suplementação com HMB realizando treinamento contra-resistido quando comparados aos que não foram suplementados.

1.12.1 HMB e câncer

É sabido que o aminoácido Leucina influencia a síntese protéica no tecido muscular esquelético, assim como também têm participação na inibição da proteólise. Entretanto, quando inibidores da transaminação da leucina, que não interferem no papel da síntese protéica, são adicionados ao meio, o efeito anticatabólico da leucina é inibido, dessa forma sugerindo que este mecanismo é realizado por um de seus metabólitos (MITCH; CLARK, 1984).

A suplementação com HMB tem demonstrado frear a perda da massa muscular de pacientes com caquexia portadores de tumor e com síndrome da imunodeficiência adquirida. Este efeito parece vir da habilidade do HMB em diminuir a atividade do sistema proteolítico ubiquitina-proteossoma ATP dependente, o que acarreta diminuição da proteólise. Isto se deve pela diminuição da ativação da Proteína quinase C (PKC) pelo PIF. A PKC age na fosforilação da quinase IKK e posterior ativação do fator de transcrição NF- κ B levando ao aumento da transcrição gênica das subunidades α e β do proteossoma 20S (SMITH, 2005).

1.13 Treinamento contra-resistido e câncer.

O primeiro estudo publicado referente a treinamento contra-resistido e câncer foi realizado por CUNNINGHAM et al. (1986) com pacientes portadores de leucemia aguda submetidos a transplante de medula óssea com uma frequência de 3 a 5 vezes por semana. O treinamento consistiu de diversos exercícios abrangendo membros superiores, inferiores e tronco. Todos exercícios realizados em 15 repetições com intensidade inespecífica durante 35 dias de hospitalização. Foram avaliadas dobras cutâneas, circunferência de braço, balaço de nitrogênio e excreção de creatinina. Os resultados mostraram não ter havido diferença na circunferência de braço e medidas de dobras e no balanço nitrogenado no decorrer do estudo, porém em ambos os grupos exercitados houveram resultados significativos em se tratando da excreção de creatinina, um marcador de massa muscular.

Em outro estudo, SEGAL et al. (2003) realizaram um protocolo de treinamento contra-resistido envolvendo exercícios de membros superiores e inferiores com duração de 12 semanas usando como parâmetro de intensidade 60% a 70% de 1 repetição máxima (1RM) em pacientes com câncer de próstata submetidos a tratamento de privação de androgênio. Os resultados mostraram que o treinamento diminuiu os níveis de fadiga, melhorou aspectos relacionados a qualidade de vida, além de melhorar a força muscular, porém sem alterações na composição corporal. O autor justifica que a não alteração de parâmetros relacionados com a composição corporal pode ser devido ao pequeno tempo de treinamento, ou ainda pelos métodos rudimentares utilizados para medir mudanças nos tecidos muscular e adiposo.

Corroborando os benefícios deste tipo de treinamento, Nunes E. A. (2005), mostrou em ratos portadores de Tumor de Walker 256, melhora do quadro imunitário e parâmetros de caquexia após desenvolver treinamento contra resistido.

Enquanto o exercício aeróbico promove aumento da resistência à fadiga, o exercício contra-resistido aumenta a massa muscular juntamente com uma diminuição da perda protéica derivada uma variedade de condições catabólicas (NUNES, 2005).

A perturbação fisiológica desencadeada por uma sessão de treinamento de força, eleva as taxas de síntese protéica no tecido muscular esquelético (FARRELL et al., 1999) e pode induzir a ganhos significativos de força e massa magra nos indivíduos que o praticam (KADI, 2000; BARACOS, 2001). Esta observação levou alguns pesquisadores a utilizar protocolos envolvendo esse tipo de atividade em indivíduos apresentando alto índice de perda de tecido muscular. FERRANDO et al. (1997) utilizaram em seu estudo, protocolo de treinamento de força, por período de duas semanas, em indivíduos jovens, saudáveis, que deveriam ficar acamados durante o tempo de realização do experimento. Após as duas semanas, foi mensurada a síntese protéica no músculo vasto lateral da coxa nos grupos treinados e controle, não treinado. O grupo que praticou o exercício de força, enquanto estava acamado, apresentou síntese protéica 42% maior que o grupo não treinado. Em indivíduos portadores de HIV que desenvolvem a doença, oito semanas de treinamento de força promoveram ganhos de massa muscular, sendo os indivíduos com o mais alto grau de perda de massa magra os maiores beneficiados, atingindo ganho de 4kg ao final das oito semanas (ROUBENOFF et. al., 1999). Em outro trabalho a respeito desse mesmo estudo, foi evidenciado o aumento de força nos indivíduos, o que acarretou em melhoria da qualidade de vida dos pacientes (ROUBENOFF; WILSON, 2001). Mesmo que os resultados sejam animadores, certa cautela deve ser tomada, pois alguns pacientes estavam ingerindo drogas antiproteolíticas durante o período do experimento como parte do conjunto de drogas para combater a proliferação do vírus.

NIEMAN et al. (1995) observaram ganho de força em mulheres com câncer de mama, que realizaram programa de exercícios por oito semanas. O programa consistiu de exercícios de resistência e força. As pacientes faziam caminhadas de 30 minutos a 75% da frequência cardíaca máxima e, após a caminhada, sessão de 30 minutos de treinamento de força. Devido à característica mista do protocolo empregado, é difícil relacionar o resultado positivo somente ao treinamento de força, pois trabalhos que utilizaram protocolos de resistência em pacientes com câncer, também obtiveram resultados positivos (AL-MAJID; McCARTHY, 2001a).

AL-MAJID; McCARTHY (2001b) realizou estudo com camundongos portadores do Adenocarcinoma de Colon-26 e avaliaram a resposta de 8

semanas de treinamento de força utilizando estímulos sobre o peso e a quantidade de proteína no músculo extensor longo dos dedos (EDL). As sessões eram feitas em dias alternados e compostas de dez séries de seis repetições cada. No grupo treinado portador de tumor, o músculo EDL apresentou aumento de 62% no peso e de 25% no conteúdo de proteína, quando comparado ao grupo não treinado portador de tumor. Observação interessante dos autores foi que a intensidade de treinamento utilizada no experimento não causou hipertrofia no músculo extensor longo dos dedos do grupo treinado sem tumor, o que pode significar que a musculatura debilitada e desgastada pode responder de maneira diferenciada a estímulos que, quando aplicados a indivíduos saudáveis, não produzem efeito. A literatura científica relacionada à utilização do treinamento de força para prevenir a perda de massa muscular em indivíduos com câncer é bastante pobre. Com base nesta literatura ainda não é possível assumir que o treinamento de força reduz a percepção de fadiga ou possui efeitos anabólicos significativos em músculos de indivíduos com câncer (AL-MAJID; McCARTHY, 2001a).

2. OBJETIVOS

Tem sido demonstrado que o HMB e o exercício físico moderado além de promoverem incremento da função do sistema imunitário, redução do quadro de proteólise no músculo esquelético e aumento da massa muscular também podem interferir em vias de sinalização intracelulares, as quais, influenciam no crescimento tumoral, contudo os mecanismos não são totalmente conhecidos. Assim, esse trabalho objetivou investigar alguns mecanismos sugeridos na literatura que modificam a velocidade de crescimento tumoral, em ratos suplementados com HMB e submetidos a treinamento contra-resistido por oito semanas.

Para alcançar este objetivo os seguintes parâmetros serão investigados:

- Peso do tumor;
- Proliferação das células tumorais *ex vivo* pela incorporação de [2-¹⁴C]-timidina em DNA;
- Apoptose e necrose de células tumorais por citometria de fluxo;
- Expressão das proteínas Bax e Bcl2, PIF, IκB, subunidade P65 e P52 do fator de transcrição nuclear NF-κB e IκB, por Western Blotting em células do tecido tumoral.

3 – MATERIAIS E MÉTODOS.

3.1 – MODELO EXPERIMENTAL, PROCEDIMENTOS E REAGENTES

3.1.1 - Animais

Todos os procedimentos utilizando animais foram aprovados pela comissão de ética em experimentação animal (CEEA) do Setor de Ciências Biológicas (SCB) da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Foram utilizados ratos machos albinos adultos (70 dias) da linhagem Wistar. Os animais foram obtidos no Biotério do SCB da UFPR, Campus do Centro Politécnico, Curitiba, PR.

3.1.2 - Enzimas, Reagentes e HMB

As enzimas e reagentes utilizados foram obtidos Sigma Chemical Co., St. Louis, USA. O HMB (em forma de sal de cálcio) foi gentilmente doado pela Metabolic Technologies Inc. (Ames, IA, USA).

3.1.3 - Modelo experimental

Os ratos foram mantidos em ciclo claro/escuro (12h/12h) e temperatura controlada ($23^{\circ}\text{C} \pm 1$) com livre acesso a comida e água, sendo aleatoriamente divididos em quatro grupos todos portadores de tumor: Sedentário (SW), Sedentário suplementado com HMB (SWH), Exercitado (EXW) e Exercitado suplementado com HMB (EXWH). Por volta da sexta semana de treinamento 1 mL de suspensão contendo 3×10^7 células do tumor de Walker 256 foi inoculada subcutaneamente no flanco direito dos indivíduos. Após 15 dias com o tumor, coincidindo com a oitava semana de treinamento, os animais foram ortotansados o tumor coletado, parte foi utilizado imediatamente e outra parte foi congelada em freezer -80°C . Foram utilizados, aproximadamente, 100 ratos para a realização de todos os experimentos.

3.1.4 - Pesagem dos Indivíduos e dos tumores

Durante o experimento, os animais foram pesados a cada três dias no período da manhã, sempre antes do treinamento, utilizando a balança Urano (precisão 0,01g). O tumor foi pesado em balança Denver Instrument XL-410 (precisão 0,0001g).

3.1.5 - Protocolo de treinamento

Após período de adaptação ao meio líquido (1 hora de natação por dia durante 2 dias sem utilização de carga), os animais dos grupos exercício realizaram programa de atividade física constituído de saltos em tanque com água, cuja temperatura foi mantida a $32\pm 2^{\circ}\text{C}$, com sobrecarga equivalente a 50% do peso corporal acoplado ao tórax. Foi utilizado protocolo de aumento progressivo da carga até que todos os indivíduos estivessem aptos a realizar a sessão com a carga de 50%. A sessão de treinamento era constituída de 10 séries de saltos, onde cada série durava 30 segundos, com 1 minuto de intervalo entre as séries (os indivíduos efetuaram em média 10 saltos por série). Foram feitas 4 sessões semanais de treinamento, com descanso nas quartas-feiras e fins de semana, durante 8 semanas. 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 foi correspondente a 150% do comprimento corporal do rato (ROGATTO; LUCIANO, 2001, adaptado).

3.1.6 – Suplementação com HMB

Coincidindo com o início do período de treinamento foi iniciada a administração de HMB para os grupos suplementados por gavagem na dose de 76 mg de HMB/Kg/dia, solubilizado em sacarose a 10%. A sacarose estava presente nas soluções com o intuito de atrasar o processo de esvaziamento gástrico, evitando assim brusco aumento na concentração de HMB plasmático e consequentemente excreção renal precoce (VUKOVICH et al., 2001). A cada semana foram preparadas soluções estoque, contendo HMB e sacarose (10%), pois após duas semanas existe degradação progressiva do HMB em solução (NISSEN et al., 1996).

3.1.7 - Ortotanásia dos indivíduos

Após 08 semanas de treinamento coincidindo com o 15º dia após a implantação do tumor, os animais foram ortotanasiados com o auxílio de guilhotina.

3.2 - METODOLOGIAS PARA ENSAIOS ENVOLVENDO CÉLULAS DO TUMOR DE WALKER 256

3.2.1 - Implantação do Tumor

O tumor de Walker 256 foi identificado por George Walker em 1928, no John's Hopkins University School of Medicine, em glândulas mamárias de uma rata grávida. Em 1953 e 1954 esse tumor foi transplantado em ratos por inoculação subcutânea. O tumor de Walker 256 apresenta 2 subtipos: tipo A metastisante que leva a caquexia terminal dos ratos portadores em aproximadamente 27 dias; e o tipo B que não forma metástases e induz a caquexia precoce do portador, levando a morte em 15 dias (FERNANDES, 1995). Foi injetado intraperitonealmente em um rato macho adulto uma suspensão de 2×10^7 células/mL do tumor de Walker 256 do tipo B. Após um período de cinco dias, quando constatado a ascite, o animal foi ortotanasiado e injetado 10 mL de solução salina 0,9% em sua cavidade abdominal. Em

seguida, massageado o abdome, e através de laparotomia mediana, foi coletado da cavidade abdominal, com pipeta Pasteur de plástico, o fluido contendo as células tumorais. A contagem do número de células tumorais foi feita utilizando-se câmara de Neubauer utilizando-se 100 μ L de suspensão de células em 100 μ L de Azul de Tripán. As células que se coraram em azul foram consideradas inviáveis, enquanto que as brilhantes e refringentes a luz, viáveis. 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.

3.2.2 - Proliferação celular

Após realizar todo o procedimento para isolamento das células do tumor de Walker 256, estas foram lavadas 3 vezes em tampão fosfato (PBS) contendo antibiótico (2,5 U/mL de penicilina e 2,5 μ g/mL estreptomicina, concentração final) e transferidas para tubos estéreis (50 mL). Após a quarta lavagem, as células, em condições estéreis, foram ressuspensas em meio RPMI -1640 contendo 10% de soro fetal bovino, antibiótico e 20 μ l de uma solução contendo (2-¹⁴C)-Timidina (0,02 μ Ci/poço) para incorporação no DNA. Essas (1×10^5 células/mL) foram então cultivadas por 24h a 37° C em atmosfera de 95% ar/5% CO₂.

Após este período, as células foram coletadas automaticamente em coletor múltiplo (Skatron Combi Multiple Cell Harvester, UK) em papéis filtro nº 11731 (Skatron Combi - UK). Neste processo não há necessidade de processos extrativos preparatórios para obtenção de DNA celular. Os discos de papéis contendo a radioatividade incorporada no DNA foram transferidos para frascos contendo 1 mL de líquido de cintilação e levados para mensuração em contador Beckman LS 6500. Os resultados estão expressos em contagens por minuto (cpm).

3.2.3 – Apoptose das células do tumor de Walker 256 por citometria de fluxo

Para determinação da apoptose utilizou-se Anexina V marcada com o fluorocromo fluoresceína (FITC). Anexina tem afinidade pelo fosfolípido fosfatidilserina, o qual é externalizado da monocamada interna da membrana celular para a externa durante o início da apoptose. Para determinação da necrose utilizou-se o intercalante de DNA 7-AAD. Após obtenção, como descrito anteriormente, 10^6 células tumorais de cada grupo foram usadas em duplicata de um total de quatro experimentos. Após separação das células do tecido tumoral, as mesmas foram centrifugadas a $290 \times g$ por 7 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células lavadas em tampão fosfato (PBS). O sedimentado foi ressuspensão em tampão de ligação contendo HEPES/NaOH 10 mM (pH 7,4), NaCl 140 mM e CaCl_2 2,5mM. Colocou-se então 100 μ L desta solução em tubo de citômetro e adicionou-se 5 μ L de anexina V-FITC. As amostras foram então agitadas e incubadas por 5 minutos, onde posteriormente adicionou-se 5 μ L de 7-AAD e incubou-se por mais 10 minutos. Em seguida, foi adicionado 400 μ L de tampão de ligação e as amostras foram lidas em citômetro de fluxo com software *Cell Quest*, utilizando-se o canal FL1 as para células marcadas com anexina V e FL3 para as com 7-AAD. Os gráficos estão expressos em percentual de células em apoptose.

3.3 - Quantificação protéica das amostras.

Amostras de 100mg de tumor foram homogeneizadas em Tampão de lise na proporção 1:7 com auxílio de homogeneizador de tecidos, centrifugadas por 5 minutos a 17949 x g e o sobrenadante coletado para quantificação protéica.

A quantificação protéica foi realizada pelo método Bradford (BRADFORD, 1976). A concentração de proteínas das amostras foi calculada com base em curva padrão de proteína conhecida (Albumina Sérica Bovina). As amostras de foram diluídas 25 vezes para não extrapolar a curva padrão. Foram plaqueados 250µl de solução de Bradford e 10 µl de cada um dos padrões ou das amostras (4 réplicas) em placas de 96 poços, sendo a leitura realizada em leitor de microplaca a 595 nm.

O cálculo da concentração protéica de cada amostra foi feito a partir da equação da reta ($y=ax+b$), sendo que y = absorvância e x = concentração de proteína. O valor de x encontrado foi multiplicado pela diluição da amostra (25X) para se obter a concentração de proteína da amostra em µg/ml.

3.4 - Eletroforese em gel de poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE)

Após quantificação protéica das amostras, foi realizada diluição das mesmas utilizando tampão de Laemmli de forma que a deixar a concentração final da amostra em 3 µg/µl, portanto deixando todas amostras com concentração protéica uniforme. O Tampão Laemmli constituiu-se de SDS para desnaturar a proteína e prover carga negativa constante de forma de que todas fiquem com a mesma carga na amostra; glicerol para dar à amostra densidade maior do que o Tampão de corrida; e β-mercaptoetanol (agente redutor) para desfazer pontes dissulfeto da estrutura protéica, possibilitando a separação da amostra em subunidades.

3.4.1 – Separação Eletroforética de proteína.

Ao serem submetidas a um campo elétrico, as proteínas migram de acordo com vários fatores como, por exemplo, massa molecular, carga, formato e interação com outras moléculas (proteínas e lipídeos). O método "SDS-PAGE" descrito por Laemmli em 1960 foi desenvolvido para que esta migração dependa unicamente do tamanho da proteína. O SDS (dodecil sulfato de sódio) é um poderoso detergente carregado negativamente que se liga a regiões hidrofóbicas das proteínas. O complexo formado SDS-proteína distribui carga negativa semelhante entre todas as proteínas, que migrarão para o pólo positivo do campo elétrico. Portanto, a migração das proteínas no método "SDS-PAGE" depende principalmente das suas massas moleculares. O gel de empilhamento foi preparado a 4%, permitindo que todas as proteínas migrem com a mesma velocidade no início da corrida. Após passarem pelo gel de empilhamento as amostras alcança o gel de resolução onde as amostras começam a migrar de acordo com o massa molecular das mesmas. Neste gel, a porcentagem de poliacrilamida variou de acordo com a proteína alvo. Os géis foram preparados com uma solução de acrilamida:bisacrilamida (30:1). A polimerização desta mistura inicia-se pela adição de persulfato de amônio (APS) e TEMED.

As amostras foram então submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida "SDS-PAGE" por aproximadamente 2 horas (8V/cm de gel).

3.5 - Western Blotting

O método Western Blotting surgiu em 1979, descrito por TOWBIN e colaboradores. Baseia-se na identificação de proteínas específicas pelo uso de anticorpos mono ou policlonais, incluindo a detecção, a quantidade relativa e o massa molecular de proteínas em uma mistura complexa. Após a separação das proteínas no gel, estas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, onde se procedeu ao método. A membrana foi incubada em Tampão de bloqueio, contendo 1,5% de BSA para evitar ligações inespecíficas dos anticorpos. Após bloqueada a membrana foi então incubada em tampão de incubação contendo 1,5% de BSA e o anticorpo primário contra a proteína alvo.

Para visualização da interação proteína-anticorpo foi então utilizado anticorpo secundário contra o anticorpo primário, sendo este complexado com enzima HRP (horseradish peroxidase) ou no caso do PIF utilizou-se anticorpo conjugado com Streptavidina e função Peroxidase. Pela adição de substrato quimioluminescente pode-se observar-se em filme Kodak para radiografia as proteínas Bax, Bcl2, PIF, IκB, subunidade P65 e P52 do fator de transcrição nuclear NF-κB e IκB.

3.6 - Análise Estatística

Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média e foram submetidos à análise de uma via (ANOVA) com pós teste de Tukey com significância para $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Peso Tumoral

Na Figura 9 estão apresentados os dados referentes ao peso (g) da massa tumoral dos animais dos grupos sedentário tumor (SW), sedentário suplementado com HMB (SHW), exercitado (EXW) e exercitado suplementado com HMB (EXHW). O peso do tumor nos animais do grupo SW foi de 23,32g, no SHW de 21,18g, no EXW de 10,22g e no EXHW de 10,44g. A suplementação *per se* com HMB, embora tenha esboçado uma tendência à diminuição, não reduziu significativamente a velocidade do crescimento tumoral. Já o grupo exercitado (EXW) mostrou redução de 56% e o grupo exercitado suplementado com HMB (EXHW) não mostrou efeito aditivo sobre o grupo exercício tendo redução de 55% no tamanho do tumor.

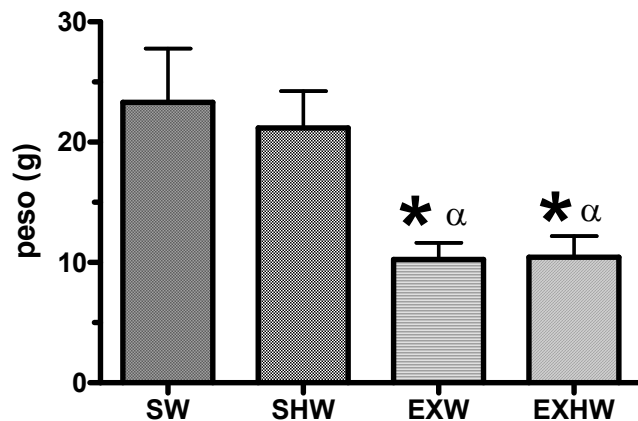


Figura 9: Peso do tumor (g) dos animais dos grupos sedentário (SW), sedentário suplementado com HMB (SHW), exercitado (EXW) e exercitado suplementado com HMB (EXHW). Os dados representam a média \pm EPM de 20 animais por grupo.

* $p < 0,05$ vs. SW;

α $p < 0,05$ vs. SHW;

4.2 Proliferação de células do tumor de Walker 256

Na Figura 10 estão apresentados os dados sobre a proliferação das células tumorais cultivadas *ex vivo* durante 24 horas, em contagens por minuto (cpm), dos grupos sedentário (SW), sedentário suplementado com HMB (SHW), exercitado (EXW) e exercitado suplementado com HMB (EXHW). A proliferação das células tumorais no grupo sedentário e suplementado mostrou-se significativamente menor ($p < 0,05$ vs. SW). A atividade física reduziu a proliferação das células tumorais em 46,8% ($p < 0,001$. SW e SHW). A associação da atividade física com a suplementação com HMB reduziu ainda mais (67,6%). Quando comparados os grupos exercitados, o grupo exercitado suplementado com HMB mostrou efeito somatório sobre o grupo exercício. ($p < 0,05$).

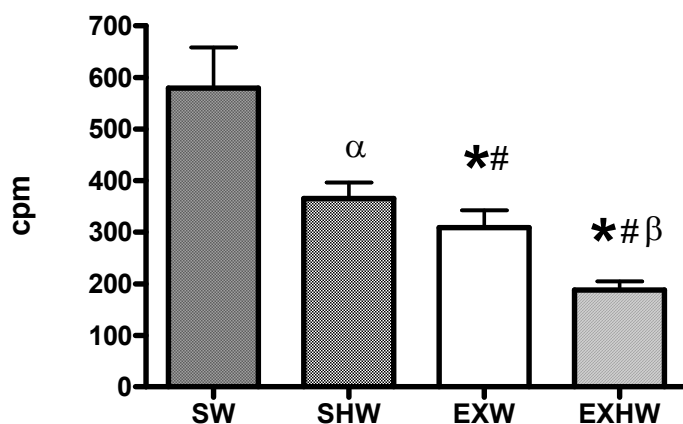
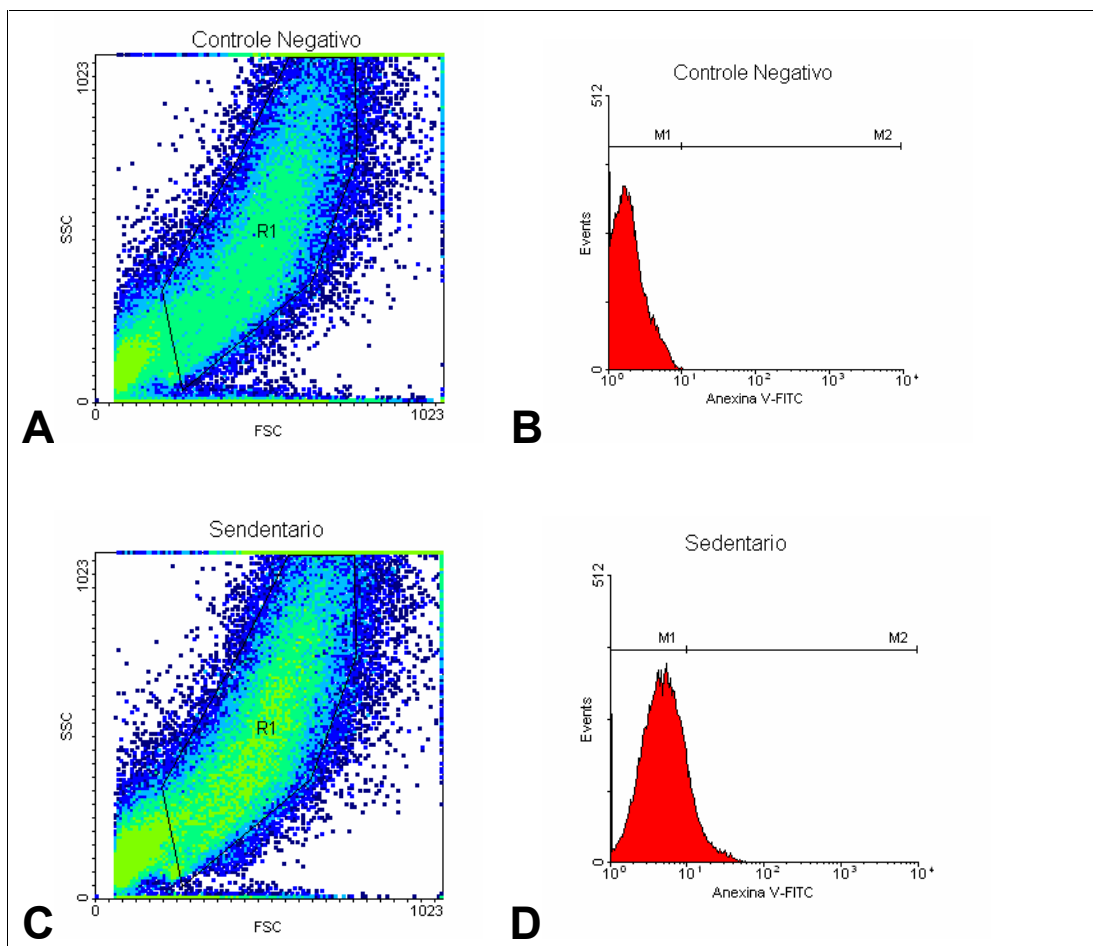


Figura 10: Proliferação das células de tumor de Walker 256, cultivadas, *ex vivo*, durante 24 horas na presença de (2-¹⁴C)-Timidina em DNA, obtidas dos tumores dos animais dos grupos dos grupos sedentário (SW), sedentário suplementado com HMB (SHW), exercitado (EXW) e exercitado suplementado com HMB (EXHW). Os dados estão apresentados como média ± EPM de 30 amostras por grupo.

α $p < 0,05$ vs. SW; * $p < 0,001$ vs. SW; # $p < 0,001$ vs. SHW; β $p < 0,05$ vs. EXW.

4.3 Apoptose das células de Tumor de Walker 256

Na Figura 11 estão apresentados os resultados referentes à apoptose das células do tumor de Walker 256 através da análise da marcação com anexina V-FITC, dos grupos sedentário (SW), sedentário suplementado com HMB (SHW), exercitado (EXW) e exercitado suplementado com HMB (EXHW). Os gráficos, no lado esquerdo, estão apresentados em *density plot*. A área com maior densidade de células, delimitada em R1, é referente a população de células do tumor de Walker 256 analisada quanto a marcação com Anexina V-FITC, e está expressa sob a forma de histograma (gráficos à direita).



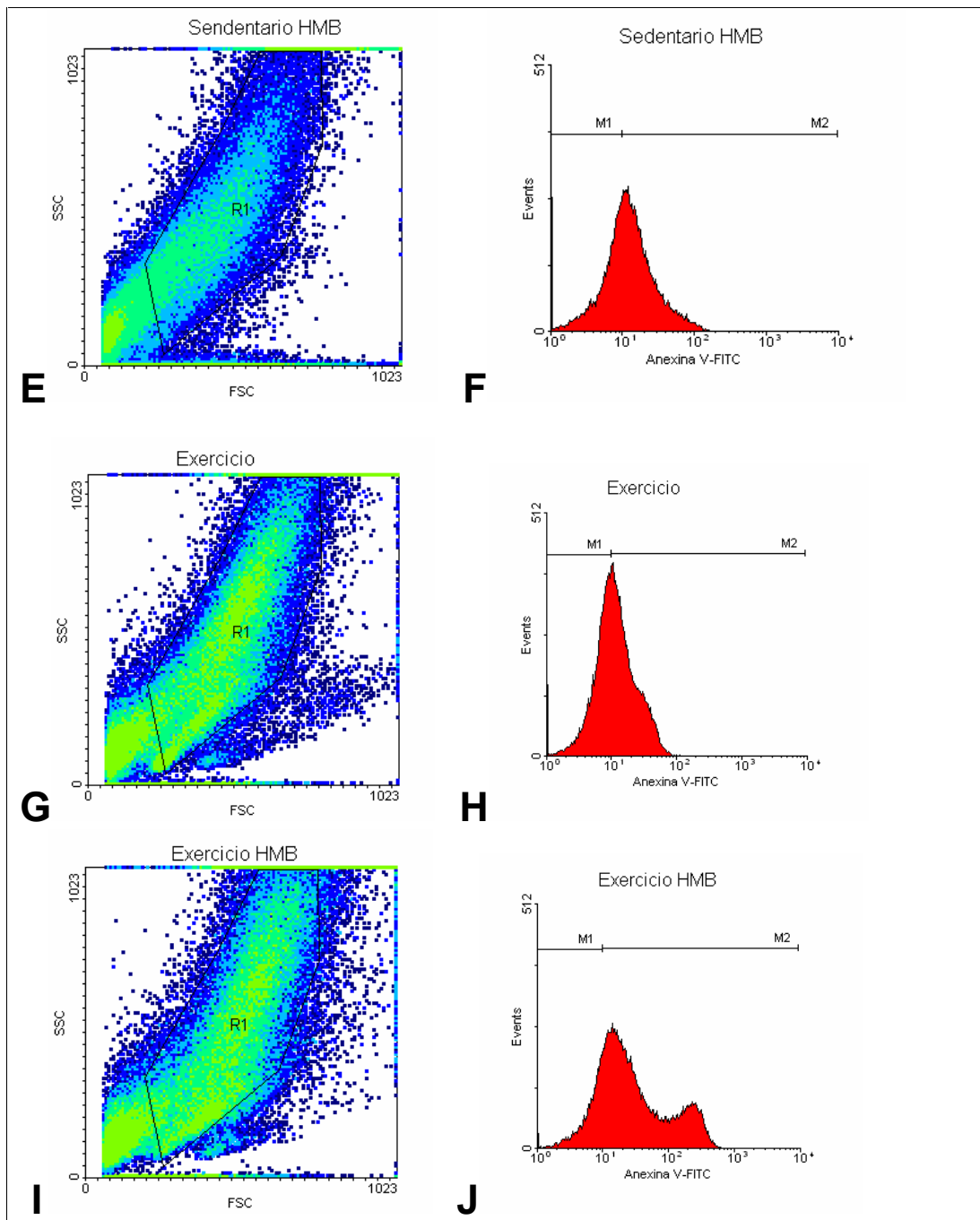


Figura 11 - Células do tumor de Walker 256 marcadas com anexina V-FITC. Gráficos A, C, E, G, I (*density plot*) mostram distribuição da população de células do tumor de Walker quanto ao tamanho e granulosidade nos grupos de animais sedentários (C), suplementados com HMB (E), submetidos ao treinamento contra-resistido (G) e submetido ao treinamento contra-resistido e suplementados com HMB (I). Gráficos D, F, H e J (histograma) representam no

gate M1 as células negativas para anexina V-FITC e no gate M2 as células positivas para anexina V-FITC. Os controles negativos de células sem marcação são mostrados nas Figuras A e B. Dados são representativos de quatro experimentos.

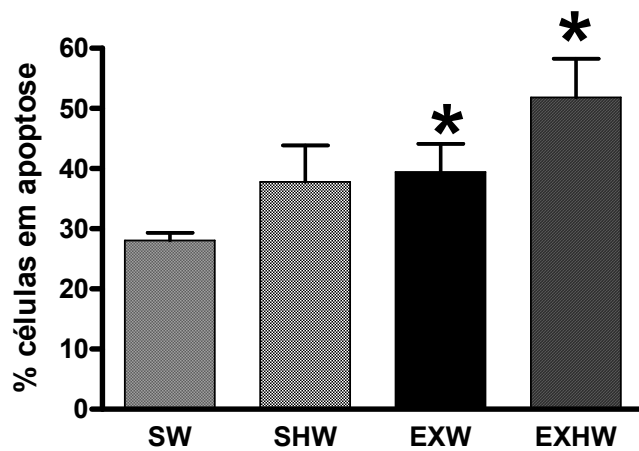


Figura 12 – Apoptose (%) de células obtidas do tumor de Walker 256 de animais sedentários (SW), sedentários suplementados com HMB (SHW), submetidos à treinamento contra-resistido (EXW) e submetidos à treinamento contra-resistido e suplementados com HMB (EXHW). Os dados estão apresentados como média±EPM. * $p < 0,05$ vs. SW.

4.4 Western blotting de proteínas no tumor de Walker 256

Expressão da proteína Bcl-2 (Figura 13) no tecido tumoral de ratos dos grupos sedentário (SW), sedentário suplementado com HMB (SHW), exercitado (EXW) e exercitado suplementado com HMB (EXHW). A suplementação com HMB não induziu a alteração significativa na expressão da Bcl2. Por outro lado, a atividade física foi hábil em promover redução de 40,5% na expressão da Bcl2 no grupo EXW ($p < 0,05$ vs. SW e SHW). A associação da atividade física com a suplementação incrementou esta redução para 58,5% quando comparada à dos grupos sedentários ($p < 0,01$ vs. SW e SHW).

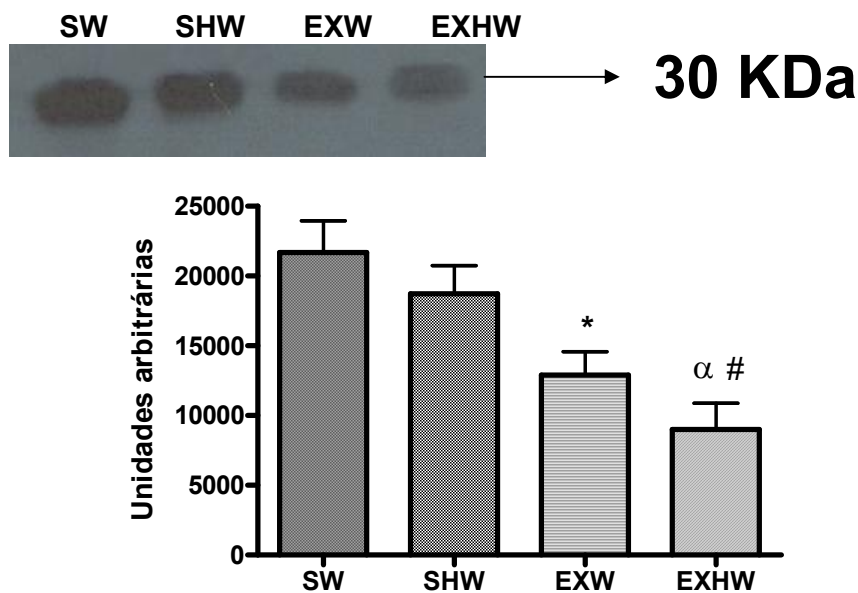


Figura 13: Expressão da proteína Bcl-2 no tecido tumoral dos animais sedentários (SW), sedentários e suplementados com HMB (SHW), exercitados (EXW) e exercitados suplementados com HMB (EXHW). Os dados estão apresentados em média \pm EPM de unidades arbitrárias.

* $p < 0,05$ vs. SW; α $p < 0,01$ vs. SW; # $p < 0,01$ vs. SHW.

A expressão da proteína Bax no tecido tumoral de ratos dos grupos sedentário (SW), sedentário suplementado com HMB (SHW), exercitado (EXW) e exercitado suplementado com HMB (EXHW) está apresentada na Figura 14. A suplementação com HMB induziu um leve aumento na expressão da proteína Bax, contudo não foi significativo ($p > 0,05$ vs. SW). A atividade física induziu a um aumento de 1,7 vezes na expressão quando comparada à do grupo sedentário sem suplementação (SW) o que foi significativo ($p < 0,05$), mas não foi diferente quando comparada a expressão no grupo sedentário suplementado ($p > 0,05$). A associação da atividade física e suplementação com HMB elevou ainda mais a expressão da Bax. Esta foi de 2,5 vezes comparada à do grupo sedentário (SW), o que foi significativo ($p < 0,05$), e de 1,7 vezes comparada à do grupo sedentário e suplementado (SHW) que também foi significativo ($p < 0,05$). Finalmente em 1,4 vezes à do grupo exercitado, contudo não foi significativo ($p > 0,05$).

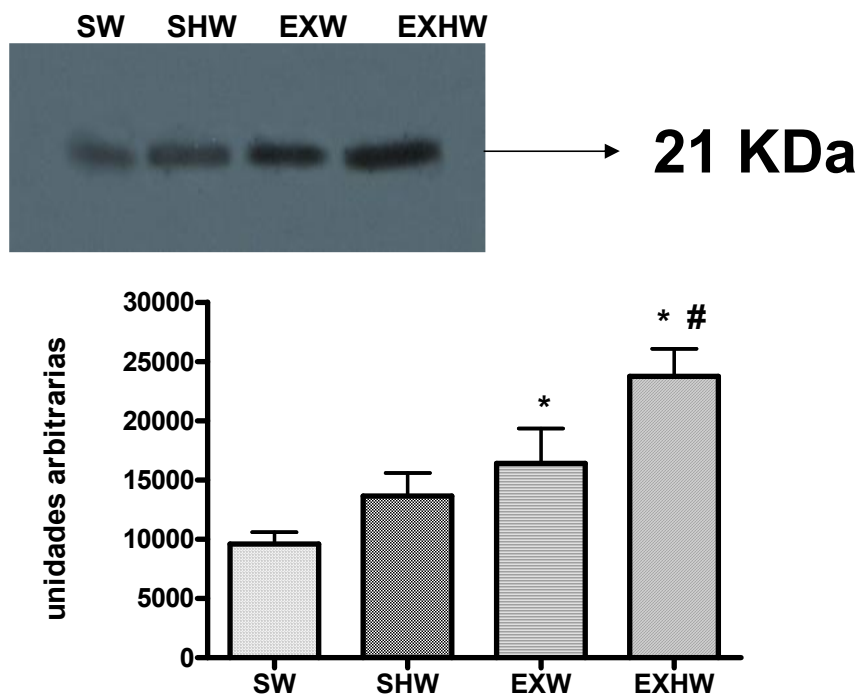


Figura 14: Expressão da proteína Bax no tecido tumoral dos animais sedentários (SW), sedentários e suplementados com HMB (SHW), exercitados (EXW) e exercitados suplementados com HMB (EXHW). Os dados estão apresentados em média \pm EPM de unidades arbitrias de 3 experimentos. * $p < 0,05$ vs. SW; # $p > 0,05$ vs. SHW.

Expressão da subunidade P65 do fator de transcrição NF- κ B (Figura 15) no tecido tumoral de ratos dos grupos sedentário (SW), sedentário suplementado com HMB (SHW), exercitado (EXW) e exercitado suplementado com HMB (EXHW). A suplementação com HMB reduziu a expressão desta proteína em 1,5 vezes ($p < 0,05$ vs. SW). A atividade física levou a uma redução de 1,75 vezes que foi significativa quando comparada à expressão do grupo sedentário ($p < 0,01$), mas não em relação à do grupo sedentário e suplementado com HMB ($p > 0,05$). A associação da atividade física e suplementação reduziu ainda mais em 6 vezes quando comparada à do SW ($p < 0,001$), em 4 vezes à do SHW ($p < 0,05$) e em 3,4 vezes à do EXW ($p < 0,05$).

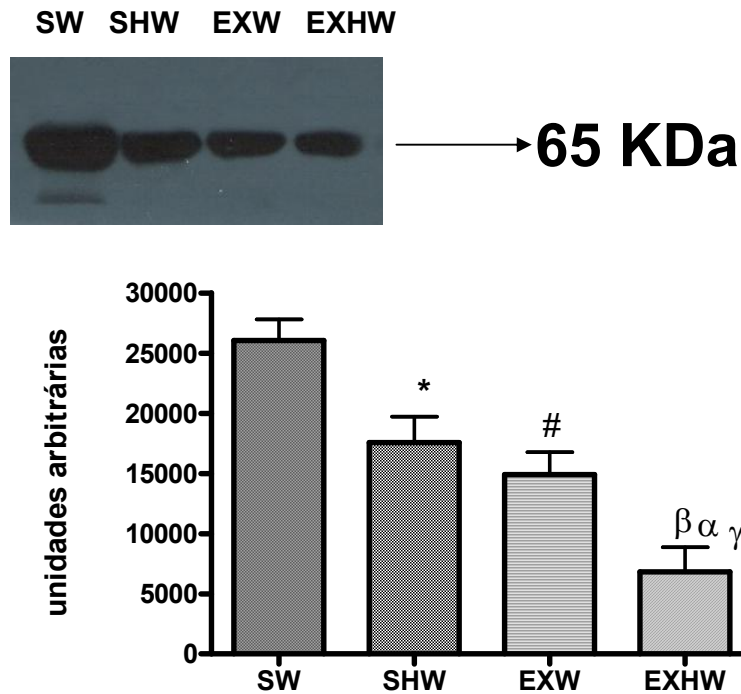


Figura 15: Expressão da subunidade P65 do NF- κ B no tecido tumoral dos animais sedentários (SW), sedentários e suplementados com HMB (SHW), exercitados (EXW) e exercitados suplementados com HMB (EXHW). Os dados estão apresentados em média \pm EPM de unidades arbitrárias de 3 experimentos. * $p < 0,05$ vs. SW; # $p < 0,01$ vs. SW; α $p < 0,001$ vs. SW; β $p < 0,05$ vs. SHW; γ $p < 0,05$ vs. EXW.

Expressão da subunidade P52 do fator de transcrição NF- κ B (Figura 16) no tecido tumoral de ratos dos grupos sedentário (SW), sedentário suplementado com HMB (SHW), exercitado (EXW) e exercitado suplementado com HMB (EXHW) Não houve diferença significativa na expressão desta proteína entre os grupos $p > 0,05$.

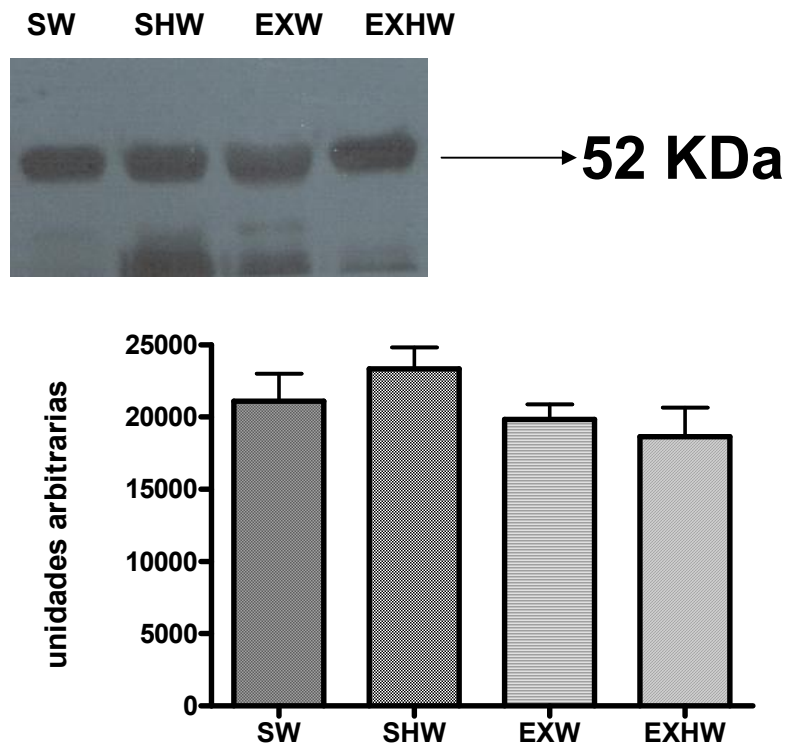


Figura 16: Expressão da subunidade P52 do NF- κ B no tecido tumoral dos animais sedentários (SW), sedentários e suplementados com HMB (SHW), exercitados (EXW) e exercitados suplementados com HMB (EXHW). Os dados estão apresentados em média \pm EPM de unidades arbitrárias de 3 experimentos.

Expressão da proteína I κ B (Figura 17) no tecido tumoral de ratos dos grupos sedentário (SW), sedentário suplementado com HMB (SHW), exercitado (EXW) e exercitado suplementado com HMB (EXHW). A suplementação com HMB aumentou a expressão da I κ B em 2,3 vezes ($p < 0,05$ vs. SW). A atividade física promoveu o mesmo efeito da suplementação com HMB ($p < 0,05$ vs SW). A associação da atividade física e suplementação com HMB tiveram efeito aditivo sobre a expressão da I κ B, elevando para 3,3 vezes quando comparada à do sedentário sem suplementação ($p < 0,001$) e em 1,4 vezes quando comparada à dos grupos SHW e EXW ($P < 0,05$).

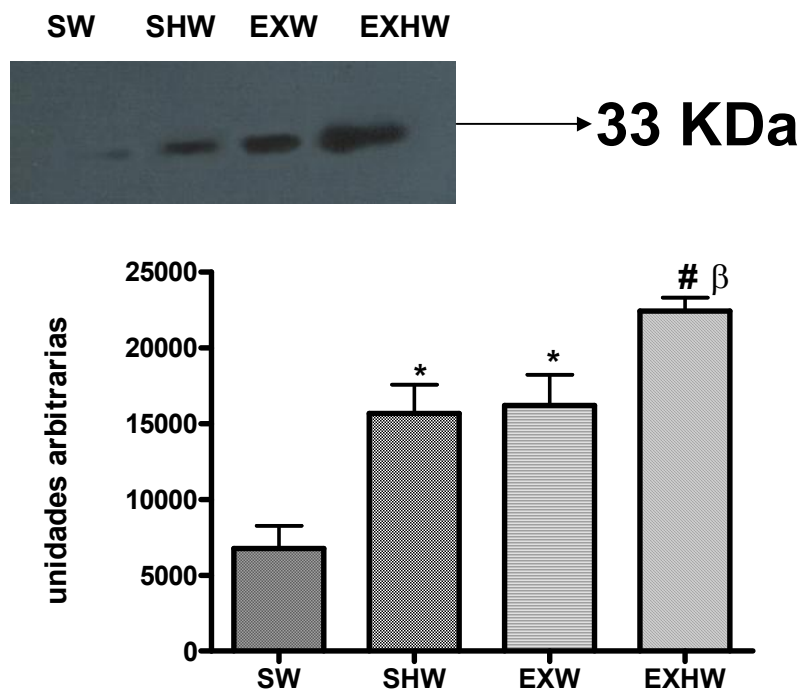


Figura 17: Expressão da proteína I κ B no tecido tumoral dos animais sedentários (SW), sedentários e suplementados com HMB (SHW), exercitados (EXW) e exercitados suplementados com HMB (EXHW). Os dados estão apresentados em média \pm EPM de unidades arbitrárias de 3 experimentos.

* $p < 0,05$ vs. SW; # $p < 0,001$ vs. SW; β $p < 0,05$ vs. EXW e EXHW.

Expressão da proteína do fator de indução de proteólise (PIF) no tecido tumoral (Figura 18) de ratos dos grupos sedentário (SW), sedentário suplementado com HMB (SHW), exercitado (EXW) e exercitado suplementado com HMB (EXHW). A suplementação com HMB não modificou a expressão do PIF ($p > 0,05$ vs. SW). A atividade física foi hábil em reduzir a expressão do PIF em 1,84 vezes quando comparada à dos grupos SW e SHW ($p < 0,05$). A associação da atividade física e suplementação com HMB, reduziu ainda mais para 2,75 vezes ($p < 0,001$ vs. SW e SHW). Quando comparado com a atividade física houve redução de 1,5 vezes ($p < 0,05$ vs. EXW).

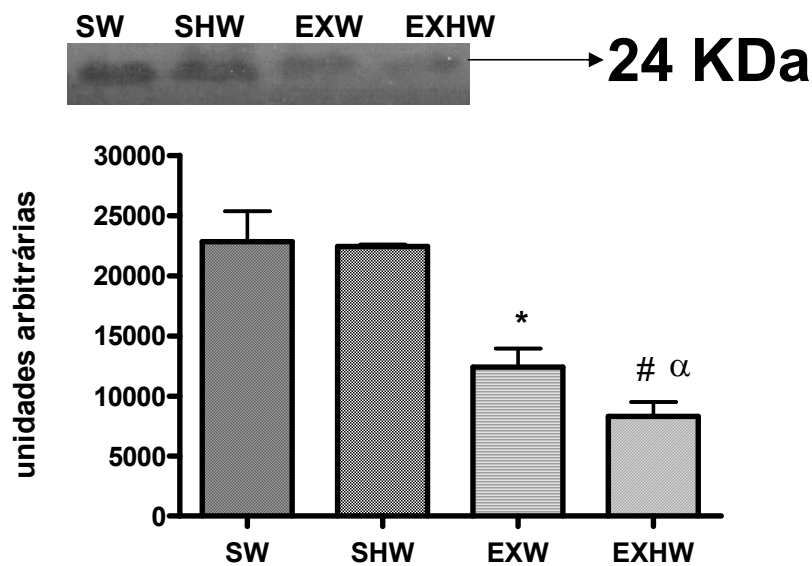


Figura 18: Expressão da proteína fator de indução de proteólise (PIF) no tecido tumoral dos animais sedentários (SW), sedentários e suplementados com HMB (SHW), exercitados (EXW) e exercitados suplementados com HMB (EXHW). Os dados estão apresentados em média \pm EPM de unidades arbitrárias de 3 experimentos. * $p < 0,05$ vs. SW e SHW; # $p < 0,001$ vs. SW e SHW; α $p < 0,05$ vs. EXW.

5. Discussão

Nunes (2005), relatou que o treinamento contra-resistido associado a suplementação com HMB foi hábil em diminuir o tamanho do tumor, contudo o mecanismo de ação não foi estudado. Vários mecanismos têm sido aventados como responsáveis pela diminuição da massa tumoral. Em linhas gerais podemos dividir em dois grandes grupos. O primeiro seria uma ação direta do HMB sobre o tecido tumoral e o segundo uma melhora da resposta do sistema imunitário decorrente da suplementação com HMB. Este estudo investiga a primeira hipótese.

A massa tumoral (Figura 08) no grupo não exercitado e suplementado (SHW), embora tenha esboçado uma redução, esta não foi significativa ($p > 0,05$) quando comparada à do grupo controle (SW). O exercício (EXW) e sua associação à suplementação com HMB reduziram significativamente o tamanho tumoral ($p > 0,05$) em relação ao controle, mas não tiveram efeito aditivo. Estes achados corroboram os de Nunes (2005). Quais são os mecanismos pelo quais HMB e o exercício físico promovem redução do crescimento tumoral? Vários mecanismos tem sido demonstrados por diferentes produtos (sejam nutracêuticos ou farmacêuticos). Dentre estes estão a alteração na razão Ácido araquidônico:Ácido eicosapentaenóico (PIZATO et al. 2006); redução na concentração de estrógenos circulantes (WU et al. 1999); alteração sobre fatores de transcrição, expressão de genes e transdução de sinais (NEBERT, 2002); supressão da ornitina descarboxilase (enzima envolvida na proliferação de células e que está elevada em tumores) (CANIZARES et al. 1999); alteração na produção de óxido nítrico (seus produtos são extremamente mutagênicos) e de espécies reativas de oxigênio (mutagênicos) (WINK, 2003) e alteração na sensibilidade à insulina (FERNANDES et al., 1990). Neste trabalho investigamos alguns destes mecanismos.

Células do tumor de Walker 256 dos quatro grupos foram cultivadas *ex vivo* (Figura 10) e em todos os grupos tratados, a taxa de proliferação celular foi significativamente diferente da do controle (SW) havendo ainda efeito aditivo do exercício e suplementação. Este resultado mostra que a redução da taxa de crescimento tumoral, promovida pela suplementação com HMB e pelo exercício

físico, é via influência no ciclo celular ou alteração na expressão gênica visto que todos os grupos tratados mostraram redução do tamanho tumoral, sendo esta, significativa nos grupos exercitados (Figura 09). Estes resultados nos sugerem que a atividade física contra-resistida assim como a suplementação com HMB são capazes de modificar a resposta proliferativa no sentido de uma redução, e baseando-se em informações sobre a ação do HMB e do exercício físico em outros tecidos, podemos levantar a possibilidade de ambos estarem agindo em nível de expressão gênica que de alguma forma modificaria a proliferação das células tumorais.

Alguns estudos tem mostrado a capacidade do exercício físico em reduzir a proliferação celular juntamente com indução da apoptose em células neoplásicas (LEUNG et al., 2004). Estas informações se baseiam no fato de o exercício físico contribuir para uma diminuição dos níveis séricos de IGF-1 e aumentar os níveis séricos da proteína ligadora de IGF-1 (IGFBP-1) (TYMCHUK et al., 1998) diminuindo ainda mais a concentração de IGF-1 livre e, portanto, reduzindo o estímulo de crescimento na célula tumoral. Acredita-se que esta mudança nos níveis séricos desta proteína possa aumentar o conteúdo da proteína p53 no tumor, a qual tem função de proteger o genoma de mutações e alterações genéticas. Quando ocorrem erros no DNA a p53 tem função de ativar genes ou fatores que causem a parada do ciclo celular ou que façam a célula entrar em apoptose a partir da transcrição de genes de proteínas pró-apoptóticas. Logo, o exercício físico é um importante coadjuvante na intervenção contra o câncer, pois o mesmo pode reduzir o estímulo de proliferação juntamente com um aumento na apoptose na célula tumoral. O aumento nos níveis de p53 no tecido tumoral leva à um aumento na relação Bax/Bcl-2 o que propicia a entrada da célula no processo de morte programada culminando com a ativação da cascata de caspases (JIANG; WANG, 2000). Este poderia ser um possível mecanismo pelo qual os grupos exercitados mostraram menores níveis de proliferação de células tumorais. Reforçando este mecanismo, quando comparados com o grupo sedentário (SW), os grupos exercício mostraram níveis significativamente menores da proteína anti-apoptótica Bcl-2 (Figura 13) e níveis significativamente maiores da proteína pró-apoptótica Bax (Figura 14). Embora não tenham sido analisados neste

estudo, sugere-se que estudos futuros sejam também analisados os níveis séricos de IGF-1.

Em tecido muscular de ratos, que sofreram tratamento com fator de indução de proteólise (PIF), SMITH H.J. et al. (2004) mostraram que o HMB diminui a degradação do tecido muscular por interferir em vias de sinalização que participam o fator de transcrição NF- κ B, a partir da proteína quinase PKC. Sendo assim, um possível mecanismo pelo qual o HMB e o treinamento contra-resistido poderiam estar influenciando o crescimento tumoral e a taxa de proliferação celular seria por interferir na ativação proteína quinase PKC, e desta forma impedir que esta, uma vez ativada, venha a promover fosforilação e posterior ativação do complexo IKK, composto por IKK α , IKK β e IKK γ . Este complexo protéico, uma vez fosforilado, promove desligamento da proteína inibitória I κ B do fator de transcrição NF- κ B através de fosforilação nos resíduos serina 32 e 36 fazendo com que o I κ B seja ubiquitinado e degradado no proteossoma. O fator de transcrição NF- κ B uma vez liberado de sua proteína inibitória que estava interferindo na sua seqüência de localização nuclear pode então seguir para o núcleo onde regula a transcrição de diversos genes para citocinas, fatores de crescimento, moléculas de adesão celular e proteínas pró- e anti-apoptóticas (ESCÁRCEGA et al., 2007). Tem sido proposto que esta via clássica de ativação do NF- κ B pode ser o ponto de ligação entre o processo inflamatório existente no ambiente tumoral e a promoção e progressão do tumor dado que muitos genes regulados pelo NF- κ B são responsáveis pela síntese de moléculas de adesão, matriz metalo-proteases, serina proteases, heparinases e quimiocinas que tem papel crucial na proliferação, invasão e metástase. Portanto, tanto o HMB quanto o exercício poderiam estar agindo interferindo em tais mecanismos (KARIN; GRETEN, 2005).

Existe também dentre as formas alternativas de ativação do NF- κ B uma via dependente estritamente de IKK α , onde dímeros desta proteína têm como alvo a proteína pertencente a família NF- κ B denominada p100. Esta proteína encontra-se no citosol geralmente formando dímero com a proteína RelB, e para que este dímero se torne ativado precisa que p100, uma vez fosforilada por IKK α , seja ubiquitinada e sofra degradação da sua porção inibitória C-terminal pelo proteossoma liberando somente a porção N-terminal denominada p52 onde dimerizada com RELB segue para o núcleo.

Dentre as proteínas que compõem a família NF- κ B as que mais comumente participam da chamada via clássica sob a forma de heterodímero são as proteínas p50 e p65 (RelA) (BONIZZI; KARIN, 2004).

Para testar a hipótese acima descrita de que o exercício contra-resistido e o HMB pudessem interferir na taxa de crescimento e proliferação do tumor de Walker via NF- κ B e conhecida na literatura científica a importância da via clássica do NF- κ B no processo de tumorigenese e da existência de outras vias alternativas na sinalização envolvendo NF- κ B, procuramos avaliar a interferência do exercício físico e da suplementação com HMB na expressão das proteínas p65 e p52 no tecido tumoral, dado suas participações na via clássica e via alternativa respectivamente. Os resultados mostrados nas Figuras 15 e 16 mostraram que tanto o treinamento contra-resistido quanto a suplementação com HMB mostraram ter influência significativa na diminuição dos níveis de expressão da proteína P65, porém sem alteração dos níveis de p52, no tecido tumoral. Ainda, a associação do exercício com a suplementação mostraram ter efeito aditivo, reduzindo ainda mais a expressão de p65.

Estes dados somados aos de proliferação celular acima mencionados, mostram que, tanto o exercício quanto o HMB podem interferir positivamente no microambiente tumoral diminuindo de forma significativa os níveis de expressão da proteína P65 e mostrando que ambos os tratamentos interagem com via clássica de ativação do fator de transcrição nuclear κ B.

Outro resultado interessante mostrado neste trabalho e que juntamente com os níveis menores de p65 reforçam ainda mais a importância do exercício físico e do HMB no câncer, foi com relação a proteína I κ B (Figura 17). BEINKE; LEY (2004), relataram que em células não estimuladas, os dímeros de NF- κ B estão inativos, pois estão seqüestrados no citosol pela sua proteína inibitória (I κ B), que como consequência os impede de exercer sua ação, pois inibem sua seqüência de localização nuclear. Portanto, pode-se inferir que com baixas concentrações de P65 e com aumento significativo da proteína inibitória I κ B no tecido tumoral, poderia estar acontecendo menor ativação deste mecanismo de transcrição tão importante na tumorigenese e portanto poderia explicar os menores índices de proliferação celular e dos tamanhos de tumor. Assim, o exercício contra-resistido e o HMB parecem ter ação anti-inflamatória no tumor semelhante à dos glicocorticóides, pois segundo SCHEINMAN et al.

(1995) sugerem em seus estudos, um dos mecanismos de ação dos glicocorticóides se baseia em bloquear a ligação do fator de transcrição NF- κ B ao DNA pelo aumento da transcrição dos genes para I κ B, mantendo-o assim quiescente no citoplasma. Corroborando com a afirmação feita acima e com os dados aqui obtidos, NEUMANN et al. (1995) relataram em seu estudo que para ocorrer inibição do NF- κ B deve haver diminuição na síntese das subunidades de NF- κ B e diminuição na degradação ou aumento na síntese da proteína inibitória I κ B.

Outro resultado de grande relevância mostrado por este estudo foi que ambos tratamentos, exercício e HMB, promoveram alterações significativas na expressão da proteínas Bax e Bcl-2, pró e anti-apoptóticas, respectivamente (Figuras 13 e 14).

Resistência à apoptose é uma das principais características adquiridas pelas células tumorais (PERKINS, 2004). Estudos mostram que o NF- κ B em sua via clássica representado pelo dímero P65-P50 sinaliza a transcrição de uma vasta gama de genes. Dentre estes genes encontra-se o da proteína anti-apoptótica Bcl-2 além dos genes da c-FLIP, c-IAP, c-IAP2, XIAP, Bcl-XL, todas também proteínas anti-apoptóticas (LI et al. 2005). A proteína Bcl-2 pró-apoptótica encontra-se ligada a membrana mitocondrial externa pela sua porção C-terminal, protegendo contra um fenômeno chave para a apoptose, que é o aumento da permeabilidade de membrana mitocondrial. Ela o faz, provavelmente, por ligar-se e inibir outras proteínas pró-apoptóticas também da família Bcl-2, por exemplo, a Bax. O aumento da permeabilidade das membranas mitocondriais pode ocasionar o efluxo de proteínas mitocondriais e promover o início de uma cascata de sinalizadora para a morte celular programada (KROEMER et al., 2007).

Outra proteína reguladora do processo de apoptose é a Bax, pertencente a família das Bcl-2, porém com ação pró-apoptótica e que na sua estrutura têm somente 03 domínios BH (Bcl-2 homólogo) ao invés de 04 como a Bcl-2. Têm sido postulado que esta proteína exerce sua função dirigindo-se do citosol para a membrana mitocôndrial externa onde forma complexos homooligoméricos com outros constituintes da família Bcl-2 (Bak) que dão origem a poros na membrana ou podendo ainda formar heterooligomeros com os constituintes do complexo do poro de transição de permeabilidade da

membrana mitocondrial e também originam poros. Os poros formados promovem aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial e a liberação de proteínas do espaço intermembranas como, por exemplo, o citocromo C. O citocromo C que além de ser uma proteína que atua como uma lançadeira de elétrons no processo bioenergético mitocondrial, uma vez no citosol juntamente com o fator de indução de proteases apoptóticas 1 (APAF-1) forma o apoptossomo que promove a maturação proteolítica da caspase-9 e essa finalmente à ativação das caspases efetoras que levam ao fenótipo apoptótico (GODVADZE; ORRENIUS, 2006)

A relação entre as concentrações de proteínas pró e anti-apoptóticas como, por exemplo, Bax e Bcl2 serve como fator determinante na propensão da célula entrar ou não em apoptose (Figura 19).

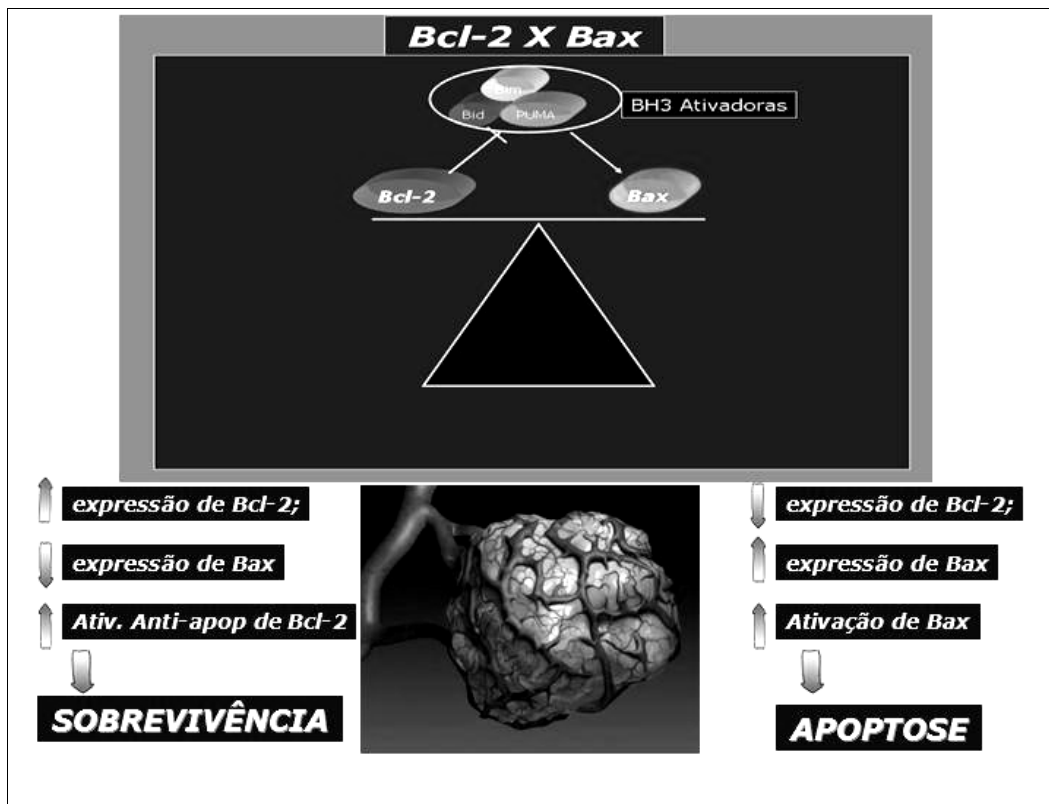


Figura 19 – relação entre a expressão das proteínas anti e pró-apoptóticas da família Bcl-2 e o destino celular de apoptose ou sobrevivência.

Portanto, com os dados obtidos pelo presente trabalho, conseguimos demonstrar que a realização de exercícios contra-resistidos e a suplementação com HMB mostraram favorecer balanço pró-apoptótico no ambiente tumoral, visto a significativa diminuição da expressão de Bcl-2 concomitante ao aumento da expressão de Bax quando comparados ao grupo controle (SW). Além disso, quando as células tumorais foram analisadas em citômetro de fluxo grupo suplementado com HMB mostrou uma tendência à uma maior porcentagem de células em processo de apoptose quando comparada ao controle. Já nos grupos exercitados, esta diferença foi significativamente maior, o que reforça ainda mais a interferência positiva dos tratamentos propostos (Figuras 11 e 12).

Desta maneira os tratamentos utilizados podem potencialmente estar interferindo não só em mecanismos de proliferação do tumor, como mostrado pelo ensaio de proliferação celular juntamente com alterações em p65, I κ B e alteração do peso tumoral, como também em vias de sinalização que levam a célula à morte, como mostrado pelo ensaio no citômetro e pela expressão das proteínas pró e anti-apoptóticas Bax e Bcl-2, respectivamente.

PIF (fator de indução de proteólise), glicoproteína sulfatada de 24KDa, que conforme citado anteriormente neste trabalho sintetizada e secretada por tumores que induzem caquexia (TODOROV et al. 1996, TISDALE et al. 2005) não mostrou alterações em seus níveis de expressão nos tumores do grupo tratado com HMB (SHW) (Figura 18). Porém, nos grupos exercitados EXW e EXHW, houve diferenças significativas com relação aos grupos controle (SW) e tumor HMB (SHW).

A interpretação destes dados demonstra que o HMB *per se* possivelmente não está influenciando nos níveis de expressão de PIF pelo tumor, porém estaria sim interferindo na sinalização do PIF dentro do ambiente tumoral como nos mostra os dados referentes a proteína I κ B, onde existem níveis significativamente maiores desta proteína no grupo tratado com HMB. Esta colocação corrobora o estudo de SMITH et al. (2004) que infere que o HMB pode agir inibindo a via de PIF por interferir na ativação da quinase PKC a qual por sua vez causaria fosforilação e posterior degradação de I κ B pelo sistema Proteossoma-ubiquitina ATP dependente. Não se sabe ao certo os mecanismos pelo qual isto acontece, contudo a inibição da proteína Fosfolipase C pelo HMB poderia ser mecanismo responsável.

De maneira distinta o exercício físico está contribuindo significativamente na expressão de PIF. Isto se mostra de extrema importância, dado o papel que esta proteína têm no quadro de caquexia induzindo a expressão de componentes do sistema proteolítico Proteossoma-ubiquitina via NF- κ B nos músculos esqueléticos e contribuindo assim para a perda de massa muscular que ocorre na caquexia e que pode levar o indivíduo a morte.

6. CONCLUSÃO

Em suma, nossos dados sugerem que a menor taxa de crescimento tumoral, observada nos grupos sedentários suplementados com HMB e exercitados suplementados ou não, tem como participantes no mecanismo de ação, a redução na expressão de proteínas envolvidas no processo de proliferação de células neoplásicas como a subunidade p65 do fator de transcrição NF-kB e incremento da expressão da proteína inibitória deste fator (IκB). Em adição houve aumento da expressão da proteína pró-apoptótica Bax e diminuição da expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2 nos grupos exercitados, o que sinaliza para um aumento no balanço pró-apoptótico do tecido tumoral. A proteína PIF, importante fator relacionado com a instalação do quadro caquético, também mostrou ter sua expressão diminuída nos grupos exercitados.

Dada à escassa bibliografia abordando o exercício contra-resistido e a suplementação com HMB no câncer, os resultados aqui mostrados indicam a importância de ambos na abordagem do quadro oncológico, contribuindo positivamente em mecanismos chave da sinalização envolvida no crescimento e proliferação de células tumorais.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, J.M.; CORY, S. The Bcl-2 protein family:Arbiters of cell survival. **Science**. 281:1322–1326, 1998.

ADAMS, J. The proteasome: a suitable antineoplastic target. **Nature Reviews Cancer**. 4, 349-360, 2004.

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

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

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. **Biologia molecular da célula**. 4^aed., Artmed, Porto Alegre, 2002.

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

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

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

AUPHAN, N.; DI DONATO, J.; ROSETTE, C.; HELMBERTG, A.; KARIN, M. Molecular basis for immuno suppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kB activity through induction of IκB synthesis. **Science**. 270:286–90, 1995.

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

BEINKE S.; LEY S. Functions of NF- κ B1 and NF- κ B2 in immune cell biology. **Biochem. J.** 382:393–409, 2004.

BERG, M.; FRAKER, D.L.; ALEXANDER, H.R. Characterization of differentiation factor/leukaemia inhibitory factor effect on lipoprotein lipase activity and mRNA in 3T3-L1 adipocytes. **Cytokine**. 6: 425–432, 1994.

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

BRUERA, E. Anorexia, cachexia and nutrition. **Br. Med. J.** 315:1219-1222, 1997.

BONIZZI G.; KARIN M., The two NF- κ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. **Trends in Immunology**. 25(6): 280-288, 2004.

BUSQUETS, S.; SANCHIS, D.; ALVERAZ, B.; RICQUIER, D.; LOPEZ-SORIANO, F.J.; ARGILES, J.M. In the rat, tumor necrosis factor- α administration results in an increase in both UCP2 and UCP3 mRNA in skeletal muscle: a possible mechanism for cytokine-induced thermogenesis? **FEBS Letters** 440: 348–350, 1998.

CHANCE, W.T.; BALASUBRAMANIAM, A.; DAYAL, R.; BROWN, J.; FISHER, J.E. Hypothalamic concentration and release of neuropeptide Y into microdialysates is reduced in anorectic tumor-bearing rats. **Life Sci.** 54(24):1869-74, 1994.

CHANCE, W.T.; BALASUBRAMANIAM, A.; THOMPSON, H.; MOHAPATRA, B.; RAMO, J.; FISCHER, J.E. Assessment of feeding response of tumor-bearing rats to hypothalamic injection and infusion of neuropeptide Y. **Peptides**. 17(5):797-801, 1996.

CHONG, H.; VIKIS, H. G.; GUAN, K. L. Mechanisms of regulating the Raf kinase family. **Cell Signal**. 15:463–469, 2003.

COSTELLI, P.; TESSITORE, L.; BATETTA, B.; MULAS, M.F.; SPANO, O.; PANI, P.; BACCINO, F.M.; DESSI, S. Alterations of lipid and cholesterol metabolism in cachectic tumor-bearing rats are prevented by insulin. **J. Nutr**. 129:700-706, 1999.

COSTELLI, P.; BOSSOLA, M.; MUSCARITOLI, M.; GRIECO, G.; BONELLI, G.; BELLANTONE, R.; DOGLIETTO, G.B.; BACCINO, F.M.; FANELLI, F.R.; Anticytokine treatment prevents the increase in the activity of ATP-ubiquitin and Ca²⁺-dependent proteolytic systems in the muscle of tumour bearing rats. **Cytokine**. 19: 1–5, 2002.

CUNNINGHAM, A. J.; MORRIS, G.; CHENEY, C. L. Effects of resistance exercise on skeletal muscle in marrow transplant recipients receiving total parental nutrition. **J. Parenter. Enteral Nutr**. 10:558-563, 1986.

CURI, R; POMPÉIA, C.; MIYASAKA, C. K.; PROCÓPIO, J. **Entendendo a gordura: os ácidos graxos**. Manole, São Paulo, 2002.

CANIZARES, F.; SALINAS, J.; DE LAS HERAS, M.; DIAZ, J.; TOVAR, I.; MARTINEZ, P.; PENAFIEL, R. Prognostic value of ornithine decarboxylase and polyamines in human breast cancer: correlation with clinicopathologic parameters. **Clin. Cancer Res**. 5(8): 2035-2041, 1999.

DROTT C., PERSSON H., LUNDHOLM K. Cardiovascular and metabolic response to adrenaline infusion in weight-losing patients with and without cancer. **Clin. Physiol**. 9:427-439, 1989.

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

D.W. NEBERT. Transcription factors and cancer: An overview. **Toxicology**. 181:131–141, 2002.

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

ESPAT, N.J.; AUFFENBERG, T.; ROSENBERG, J.J.; ROGY, M.; MARTIN, R.D.; FANG, C.H.; HASSELGREN, P.O.; COPELAND, E.M.; MOLDAWER, L.L. Ciliary neurotrophic factor is catabolic and shares with IL-6 the capacity to induce an acute phase response. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.** 271: 185–190, 1996.

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

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

FERNANDES, L.C.; MACHADO, U.F.; NOGUEIRA, C.R.; CARPINELLI, A.R.; CURI, R. Insulin secretion in Walker 256 tumor cachexia. **Am. J. Physiol.** 258(6Pt1):E1033-1036, 1990.

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

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

FOSTER I. Cancer: A cell cycle defect. **Radiography**. 2007

FUJIMOTO-OUCHI, K.; TAMURA, S.; MORI, K.; TANAKA, Y.; ISHITSUKA, H. Establishment and characterization of cachexia-inducing and non-inducing clones of murine colon 26 carcinoma. **Int. J. Cancer**. 61: 522–528, 1995.

GARCIA-MARTINEZ C, LOPEZ-SORIANO FJ, AND ARGILES JM. Acute treatment with tumour necrosis factor- α induces changes in protein metabolism in rat skeletal muscle. **Mol. Cell Biochem**. 125: 11–18, 1993.

GODVADZE, V.; ORRENIUS, S. Mitochondrial regulation of apoptotic cell death. **Chem. Biol. Interact**. 27:4-14, 2006.

HAYDEN, M. S.; GHOSH, S. Signaling to NF- κ B. **Genes&Development**. 18:2195–2224, 2004.

HELLERSTEIN, M.K.; MEYDANI, S.; MEYDANI, M.; WU, K.; DINARELLO, C.A. Interleukin-1-induced anorexia in the rat: Influence of prostaglandins. **J. Clin. Invest**. 84:228, 1989.

HU, W.; KAVANAGH, J. Anticancer therapy targeting the apoptotic pathway. **The Lancet Oncology**. 4:721-729, 2003.

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

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

KARIN, M.; GRETEN, F.R. NF- κ B: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. **Nat. Rev. Immunol**. 5:749–759, 2005.

KIM, H.; SHAH, M. R.; TU, H. C.; JEFFERS J. R.; ZAMBETTI G. P.; HSIEH, J. D.; CHENG E. H.-Y. Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by BCL-2 subfamilies. **Nature Cell Biology**. 8:1348-1358, 2006.

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

KING, P.J.; WILLIAMS, G. Role of ARC NPY neurons in energy homeostasis. **Drugs News Perspect**. 11:420-410, 1998.

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

LAVIANO, A.; MEGUID, M.M.; YANG Z.J.; GLEASON, J.R.; CANGIANO, C.; FANELLI, F.R. Cracking the riddle of cancer anorexia. **Nutrition**.12(10):706-10, 1996.

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

LI, Q.; WITHOFF, S.; VERMA, I.M. Inflammation-associated cancer: NF- κ B is the lynchpin. **TRENDS in Immunology**. 26(6):318-25, 2005.

LI, Y-P.; REID, M.B. NF- κ B mediates the protein loss induced by TNF- α in differentiated skeletal muscle myotubes. **Am. J. Physiol**. 279:1165–1170, 2000.

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

LORITE, M.J.; SMITH, H.J.; ARNOLD, J.A.; MORRIS, A.; THOMPSON, M.G.; TISDALE, M.J. Activation of ATP-ubiquitin-dependent proteolysis in skeletal muscle in vivo and murine myoblasts in vitro by a proteolysis-inducing factor (PIF). **Br. J. Cancer.** 85: 297–302, 2001.

MACDONALD, N.; EASSON, A. M.; MAZURAK, V.Z.; DUNN G.P.; BARACOS, V.E. Understanding and Managing Cancer Cachexia. **J Am Coll Surg** 197:143-161, 2003.

MAY P.E.; BARBER A.; D'OLIMPIO J.T.; HOURIHANE A.; ABUMRAD N.N. Reversal of cancer-related wasting using oral supplementation with a combination of β -hydroxy- β -methylbutyrate, arginine, and glutamine. **Am J Surg.** 183 (4):471-479, 2002.

MCMILLAN, D.C.; SCOTT, H.R.; WATSON, W.S.; PRESTON, T.; MILROY, R.; MCARDLE, C.S. Longitudinal study of body cell mass depletion and the inflammatory response in cancer patients. **Nutr. Cancer.** 31: 101-105, 1998.

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

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

NAKANISHI, C.; TOI, M. Nuclear factor- κ B inhibitors as sensitizers to anticancer drugs. **Nature Rev. Cancer.** 5:297–309, 2005.

NEUMANN M, GRIESHAMMER T, CHUVPILO S, KNEITZ B, LOHOFFM, SCHIMPL A, FRANZA B, SERFLING E. 1995. RelA/p65 is a molecular target for the immunosuppressive action of protein kinase A. **EMBO J.** 14:1991–2004, 1995.

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

NISSEN, S.; SHARP, R.; RAY, M.; RATHMACHER, J.A.; RICE, D.; FULLER, J.C. JR; CONNELLY, A.S.; ABUMRAD, N. Effect of leucine metabolite beta-hydroxy-beta-methylbutyrate on muscle metabolism during resistance-exercise training. **J. Appl. Physiol.** 81(5):2095-2104, 1996.

NISSEN, S.L.; ABUMRAD, N.N. Nutritional role of the leucine metabolite β -hydroxy- β -methylbutyrate (HMB). **Nutr. Biochem.** 8:300-311, 1997.

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

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

OLIVIER, S.; ROBE, P.; BOURS, V. Can NF-kappaB be a target for novel and efficient anti-cancer agents? **Biochem. Pharmacol.** 72:1054-68, 2006.

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

PINTO, J.A. JR; FOLADOR, A.; BONATO, S.J.; AIKAWA, J.; YAMAZAKI, R.K.; PIZATO, N.; FACIN, M.; GROHS, H.; DE OLIVEIRA, H.H.; NALIWAIKO, K.; FERRAZ, A.C.; NISHIYAMA, A.; FERNANDEZ, R.; CURI, R.; FERNANDES, L.C. Fish oil supplementation in F1 generation associated with naproxen, clenbuterol, and insulin administration reduce tumor growth and cachexia in Walker 256 tumorbearing rats. **J. Nutr. Biochem.** 15(6):358-65, 2004.

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

REEDS, P.J.; FJELD, C.R.; JAHOOON, F. Do the differences between the amino acid composition of acute-phase and muscle proteins have a bearing on nitrogen loss in traumatic states? **J. Nutr.** 124: 906–910, 1994.

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

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

ROTH, W.; REED, J.C. Apoptosis and cancer: when BAX is TRAILing away. **Nat. Med.** 8: 216-218, 2002.

ROUBENOFF R, WEISS L, MCDERMOTT A.. A pilot study of exercise training to reduce trunk fat in adults with HIV-associated fat redistribution. **AIDS**.13:1373-1375, 1999.

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

SCHEINMAN, R.; COGSWELL, P.; LOFQUIST, A.; BALDWIN, A. Role of transcriptional activation of I κ B α in mediation of immuno suppression by glucocorticoids. **Science**. 270:283–86, 1995.

SEGAL, R. J.; REID, R. D.; COURNEYA, K. S.; MALONE, S. C.; PARLIAMENT, M. B.; SCOTT, C. G. Resistance exercise in men receiving androgen deprivation therapy for prostate cancer. **J. Clin. Oncol.** 21(9): 1653-1659, 2003.

SMITH, H.J.; TISDALE, M.J. Signal transduction pathways involved in proteolysis-inducing factor induced proteasome expression in murine myotubes. **Br. J. Cancer.** 89:1783-1788, 2003.

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

SMITH, H. J.; WYKE, S. M.; TISDALE, M. J. Role of protein kinase C and NF- κ B in proteolysis-inducing factor-induced proteasome expression in C₂C₁₂ myotubes. **British Journal of Cancer.** 90:1850-1857, 2004

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

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

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

THOMPSON, MP.; COOPER, S.T.; PARRY, B.R.; TUCKEY, J.A. Increased expression of the mRNA for hormone sensitive lipase in adipose tissue of cancer patients. **Biochim. Biophys. Acta** 1180: 236–242, 1993.

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

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

TISDALE M.J. Cachexia in cancer patients. **Nature reviews Cancer**. 2: 862-871, 2002.

TISDALE, M.J. Pathogenesis of cancer cachexia. **J. Support. Oncol.** 1:159-168, 2003.

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

TODOROV, P.; CARIUK, P.; MCDEVITT, T.; COLES, B.; FEARON, K.; TISDALE, M.J. Characterization of a cancer cachetic factor. **Nature**. 379:739-742, 1996.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of National Academy of Sciences of the USA**, 76 (9): 4350-4354, 1979.

TSUJINAKA, T.; FUJITA, J.; EBISUI, C.; YANO, M.; KOMINAM, I. E.; SUZUKI, K.; TANAKA, K.; KATSUME, A.; OHSUGI, Y.; SHIOZAKI, M.; MODEM, M. Interleukin 6 receptor antibody inhibits muscle atrophy and modulates proteolytic systems in interleukin 6 transgenic mice. **J. Clin. Invest.** 97: 244–249, 1996.

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

VERMEULEN K, VAN BOCKSTAELE DR, BERNEMAN ZN. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. **Cell Prolif.** 36:131-149, 2003.

VUKOVICH, M.D.; STUBBS, N.B.; BOHLHEN, R.M. Body composition in 70-year old adults responds to dietary 3-hydroxy-3-methylbutyrate (HMB) similar to that of young adults. **J. Nutr.** 131(7): 2049-2052, 2001.

WATANOBE, H.; TAKEBE, K. Intravenous administration of tumor necrosis factor-alpha stimulates corticotropin releasing hormone secretion in the push-pull cannulated median eminence of freely moving rats. **Neuropeptides.** 22: 81-84, 1992.

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

WHITEHOUSE A.S.; TISDALE, M.J. Increased expression of the ubiquitin-proteasome pathway in murine myotubes by proteolysis induction factor (PIF) is associated with activation of the transcription factor NF-kB. **Br J Cancer.** 89: 1116-1112, 2003.

WINK, D.A.; MITCHELL, J.B. Nitric oxide and cancer: An introduction. **Free Radical Biology and Medicine.** 34(8):951-954, 2003.

WU, A.H.; PIKE, M.C.; STRAM, D.O. Meta-analysis: dietary fat intake, serum estrogen levels, and the risk of breast cancer. **J. Natl. Cancer Inst.** 91:529-534, 1999.

ZHANG, A.; WU, Y.; LAI, H. W.L; YEW, D.T. Apoptosis – A Brief Review. **Neuroembryology.** 5:47-59, 2004.

ZHANG, H.H.; HALBLEIB, M.; AHMAD, F.; MANGANIELLO, V.C.; GREENBERG, A.S. Tumor necrosis factor-alpha stimulates lipolysis in differentiated human adipocytes through activation of extracellular signal-related kinase and elevation of intracellular cAMP. **Diabetes.** 51: 2929-2935, 2002.