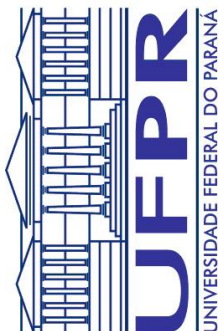
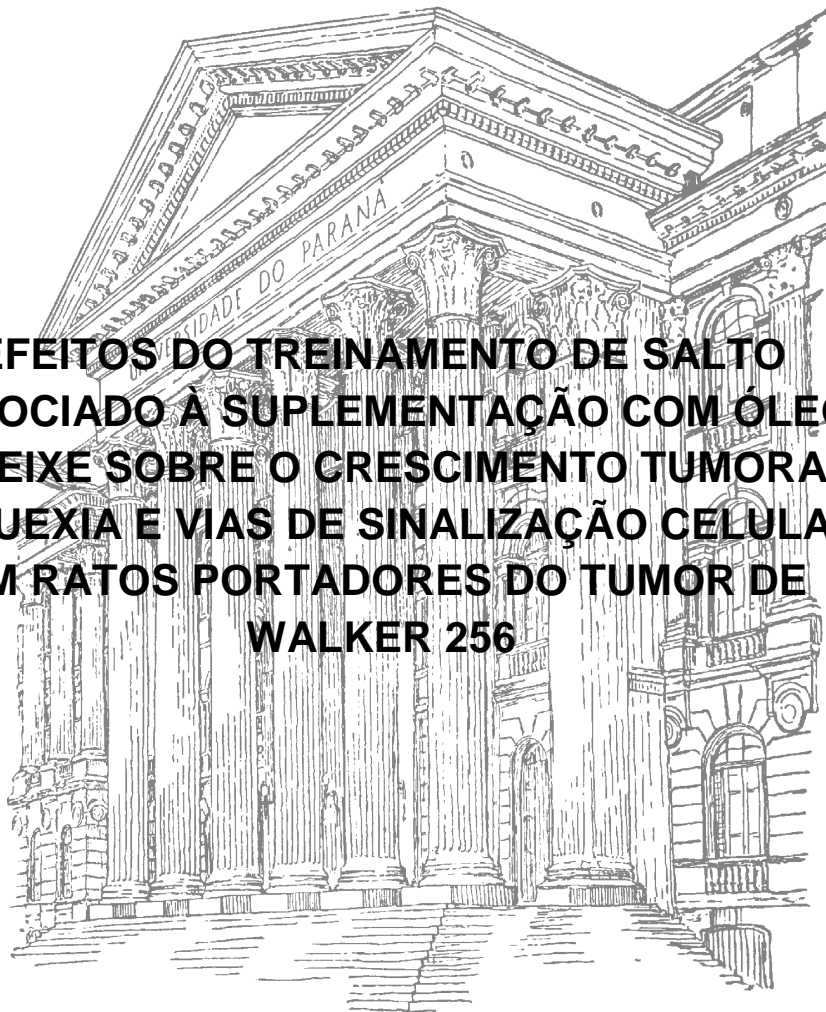


RENATA TEIXEIRA MAMUS GOMES

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM EDUCAÇÃO FÍSICA

**EFEITOS DO TREINAMENTO DE SALTO  
ASSOCIADO À SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO  
DE PEIXE SOBRE O CRESCIMENTO TUMORAL,  
CAQUEXIA E VIAS DE SINALIZAÇÃO CELULAR  
EM RATOS PORTADORES DO TUMOR DE  
WALKER 256**



CURITIBA

2013

**RENATA TEIXEIRA MAMUS GOMES**

**EFEITOS DO TREINAMENTO DE SALTO  
ASSOCIADO À SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO  
DE PEIXE SOBRE O CRESCIMENTO TUMORAL,  
CAQUEXIA E VIAS DE SINALIZAÇÃO CELULAR  
EM RATOS PORTADORES DO TUMOR DE  
WALKER 256**

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutora em Educação Física do Programa de Pós-Graduação em Educação Física, do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

**Orientador: Prof. Dr. Luiz Cláudio Fernandes**



# TERMO DE APROVAÇÃO

## RENATA TEIXEIRA MAMUS GOMES

**“Efeitos do treinamento de salto associado à suplementação com óleo de peixe sobre o crescimento tumoral, caquexia e vias de sinalização celular em ratos portadores do tumor de Walker 256”**

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Educação Física – Área de Concentração Exercício e Esporte, Linha de Pesquisa Atividade Física e Saúde, do Programa de Pós-Graduação em Educação Física do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte Banca Examinadora:

\_\_\_\_\_  
Professor Dr. Luiz Cláudio Fernandes (Orientador)  
BL / UFPR

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Sandro Bonatto  
Membro Externo

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Raul Osiecki  
Membro Interno

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Marcelo Kryczyk  
Membro Externo

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Ricardo Tanhoffer  
Membro Externo

Curitiba, 25 de Janeiro de 2013.

## **AGRADECIMENTOS**

À DEUS,

Pelo milagre da vida e pelo amor incondicional concedido à mim duas vezes: meu próprio nascimento e o nascimento da minha filha Sara. Obrigado Senhor!

AOS MEUS ETERNOS AMORES,

Fábio e Sarinha... eu sem vocês eu não tenho porque... vocês são meu “Porto Seguro”. Obrigado meus amores!

À MINHA FAMÍLIA,

Pelo amor e apoio de sempre... sem vocês eu jamais teria alcançado as grandes realizações da minha vida. Obrigado meus queridos!

AOS MEUS AMIGOS,

Pelo apoio incondicional em todos os momentos, principalmente naqueles mais difíceis, porque rir junto é fácil, enxugar as lágrimas, nem sempre. Obrigado meus amigos!

AO ORIENTADOR,

Pelo voto de confiança em minha pessoa e pela oportunidade de aprender... muito! Obrigado Mestre!

AOS COLEGAS DO LABORATÓRIO,

Pelo apoio, pela paciência e principalmente pelo conhecimento que oportunizaram nestes curtos mas intensos dois anos de convivência. Obrigado pessoal!

"Nas grandes batalhas da vida, o primeiro passo para a vitória é o desejo de vencer".

Mahatma Gandhi

## RESUMO

**OBJETIVO:** Este estudo investigou, em ratos portadores do tumor de Walker 256, o efeito do treinamento de salto associado à suplementação com óleo de peixe (1g/kg peso corporal/dia) sobre parâmetros bioquímicos de caquexia e crescimento tumoral.

**MÉTODOS:** Ratos foram divididos em sedentário sem ou com tumor (S ou SW), exercitado (EX ou EXW), suplementado com óleo de peixe (SO ou SWO) e suplementado e exercitado (EXO ou EXWO). Sessões de treinamento de salto consistiram de 10 séries com duração de 30 segundos e intervalo de 1 minuto entre cada série. Após seis semanas de treinamento, células do tumor de Walker 256 foram inoculadas e após 15 dias os animais foram mortos.

**RESULTADOS:** Peso médio do tumor no grupo SW foi de 25,32 g,  $p < 0,05$  vs. ao dos SWO, EXW e EXWO (~11 g). Grupo SW apresentou hipoglicemia, hiperlactatemia, hipertriacilglicerolemia e perda de peso ( $-7,52 \pm 3,19$ g), caracterizando estado caquético. Suplementação com óleo de peixe (SWO), exercício (EXW) e associação de ambos (EXWO) impediram a instalação da caquexia ( $p < 0,05$  vs. SW). No grupo SWO, EXW e suas associações (EXWO) promoveram ganho de peso ( $p < 0,05$  vs. SW), mas inferior ao da suplementação isolada ( $p < 0,05$  vs. SWO). Proliferação celular in vitro das células tumorais foi menor no grupo SWO ( $p < 0,05$  vs. SW) e o exercício reduziu ainda mais ( $p < 0,05$  vs. SW e SWO), não havendo incremento quando se associaram ambas as terapias. Lipoperoxidação ( $p < 0,05$ ) foi maior nos SWO, EXW, EXWO vs. S. A expressão de Bcl-2 foi menor também nestes grupos vs. SW.

**CONCLUSÕES:** O treinamento de força e a suplementação com óleo de peixe foram eficazes em evitar a instalação da caquexia e induzir a redução do crescimento tumoral, da proliferação tumoral e expressão de Bcl-2, mas a associação de ambos não promoveu efeito aditivo.

**Palavras-chaves:** exercício, câncer, caquexia, suplemento dietético.

## ABSTRACT

**OBJECTIVE:** This study investigated the effect of jump training, fish oil (FO) supplementation and both on biochemical parameters of cachexia and tumor growth in Walker 256 tumor-bearing rats. **METHODS:** Rats were divided into sedentary non- and tumor-bearing (S and SW), exercise (EX and EXW), FO supplemented (SO and SWO) and both therapy (EXW and EXWO). Training sessions (jump training) consisted of 10 bouts, 30 seconds each followed by 1 minute of resting. After six weeks of jump training, ascitic cells from Walker 256 tumor bearing-rat were inoculated and after 15 days all groups were killed. **RESULTS:** Tumor weight was higher in the sedentary (SW = 25,32g). In the SWO, EXW and EXWO were about 11 g ( $p < 0,05$ ). Sedentary showed hypoglycemia, hyperlactacidemia and hypertriacylglycerolemia and body weight reduction ( $-7,52 \pm 3,19g$ ), characterizing cachexia state. In the SWO, EXW and EXWO there were no cachexia presence and also did not lose weight. Associated to tumor weight reduction in the SWO, EXW and EXWO groups there was an increase in the lipoperoxidation, reduction in the cell proliferation ex vivo and also in the expression of Bcl-2 protein in the tumor tissue from these groups. **CONCLUSIONS:** Jump training and fish oil supplementation alone were able in to avoid the installation of cachexia state and also reduced tumor growth, tumor cells proliferation and the expression of Bcl-2, increasing lipoperoxidation, but the combination of both did not cause any additive effect.

**Keywords:** exercise, cancer, cachexia, dietary supplements.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>FIGURA 1:</b> Perfil do consumo de gordura e ácidos graxos da espécie humana ao longo dos anos. Adaptado de SIMOPOULOS (1999).....	15
<b>FIGURA 2:</b> As etapas da Carcinogênese (INCA, 2002) .....	18
<b>FIGURA 3:</b> Via extrínseca da apoptose celular. Adaptado de JIN; EL-DEIRY (2005) .....	21
<b>FIGURA 4:</b> Via intrínseca de sinalização mitocondrial da apoptose. Adaptado de JIN; EL-DEIRY (2005) .....	22
<b>FIGURA 5:</b> Ciclo de Cori. Adaptado de M.W. King (1996) .....	25
<b>FIGURA 6:</b> Sistema proteosoma ubiquitina-ATP dependente. Adaptado de PESSINI (2007).....	26
<b>FIGURA 7:</b> Patogênese metabólica da caquexia. Adaptado de GIACOSA; RONDANELLI (2008) .....	28
<b>FIGURA 8:</b> Estrutura e metabolismo dos PUFAs n-6 e n-3. Adaptado de Calder (2005).....	33
<b>FIGURA 9:</b> Glicemia (mg/dL) .....	47
<b>FIGURA 10:</b> Lactato plasmático (mmol/L).....	48
<b>FIGURA 11:</b> Triacilglicerol plasmático (mg/dL).....	49
<b>FIGURA 12:</b> Peso dos tumores após 15 dias de inoculação do tumor .....	50
<b>FIGURA 13:</b> Proliferação de célula tumoral “ <i>ex vivo</i> ” .....	52
<b>FIGURA 14:</b> Lipoperoxidação (nmol/mg proteína no tumor).....	53
<b>FIGURA 15:</b> Expressão de Bcl-2 no tecido tumoral (unidades arbitrárias) .....	54
<b>FIGURA 16:</b> Peroxidação lipídica: uma reação em cadeia. Adaptado de HALLIWELL & GUTTERIDGE (1991) .....	60

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1:</b> Divisão dos grupos .....	37
<b>TABELA 2:</b> Resumo dos dados: Glicemia, Lactato e TAGs .....	88
<b>TABELA 3:</b> Peso corpóreo antes e após implantação do tumor.....	51

## LISTA DE ABREVIATURAS

- ACSM:** Colégio Americano de Medicina e Esporte
- APAF-1:** Fator de indução de proteases apoptóticas -1
- AMP:** Adenosina monofosfato
- AGs:** Ácidos graxos
- AGE:** Ácidos graxos essenciais
- AGI:** Ácidos graxos insaturados
- AGMI:** Ácidos graxos monoinsaturados
- AGPI:** Ácidos graxos poliinsaturados
- AGPI n-3:** Ácidos graxos poliinsaturados ômega -3
- AGPI n-6:** Ácidos graxos poliinsaturados ômega -6
- AL:** Ácido Linoléico
- ALA:** Ácido  $\alpha$ -Linolênico
- ATP:** Adenosina Trifosfato
- CEEA:** Comitê de ética em experimentação animal
- CPM:** Contagem por minuto
- DHA:** Ácido Docosahexaenóico
- DNA:** Ácido Desoxirribonucléico
- EDTA:** Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
- E1:** Enzima ativadora de ubiquitina
- E2:** Enzima de conjugação de ubiquitina
- E3:** Proteína ligase de ubiquitina
- EDL:** Músculo *extensor digitorum longus*
- EPA:** Ácido Eicosapentaenóico
- EROs:** Espécies reativas de oxigênio
- ERK:** Quinase regulada por sinal extracelular
- EX:** Grupo exercitado
- EXO:** Grupo exercitado suplementado com óleo de fígado de peixe
- EXW:** Grupo exercitado portador de tumor
- EXWO:** Grupo exercitado portador de tumor suplementado com óleo de peixe
- HSL:** Lipase hormônio-sensível
- IGF -1:** Fator de crescimento parecido com a insulina

**IGFBP-1** - Proteína ligante ao IGF-1

**IL:** Interleucina

**IL-1:** Interleucina-1

**IL-6:** Interleucina 6

**INCA:** Instituto Nacional do Câncer

**LDh:** Lactato desidrogenase

**LPL:** Lipase lipoprotéica

**LPO:** Peroxidação Lipídica

**mRNA:** Ácido Ribonucléico mensageiro

**n-3:** Ácidos Graxos da Família Omega 3

**n-6:** Ácidos Graxos da Família Omega 6

**n-9:** Ácidos Graxos da Família Omega 9

**NAD:** Nicotinamida adenina dinucleotídeo

**NADH:** Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Reduzida

**NF- $\kappa$ B:** Fator de Transcrição Nuclear  $\kappa$  B

**OMS:** Organização Mundial da Saúde

**PIF:** Fator indutor de proteólise

**PKC:** Proteína quinase C

**PBS:** Solução tampão fosfato

**RNA:** Ácido ribonucléico

**rpm:** Rotações por minuto

**SDS:** Dodecil sulfato de sódio

**SDS-PAGE:** Eletroforese em gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio

**SO:** Grupo sedentário suplementado com óleo de peixe

**SW:** Grupo sedentário portador de tumor

**SWO:** Grupo sedentário portador do tumor suplementado com óleo de peixe

**TAG:** Triacilglicerol

**TBS:** Solução tampão tris

**TEMED-** N,N,N',N': Tetrametiletileno-diamino

**TNF- $\alpha$ :** Fator de Necrose Tumoral Alfa

**Ub:** Ubiquitina

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>17</b>
2.1 CÂNCER: CAUSAS E ESTIMATIVAS .....	17
2.2 MORTE CELULAR .....	19
2.3 CAQUEXIA.....	23
2.4 CÂNCER E EXERCÍCIO .....	28
2.5 CÂNCER E ÁCIDOS GRAXOS.....	31
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>35</b>
3.1 OBJETIVO GERAL .....	35
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	35
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>36</b>
4.1 MODELO EXPERIMENTAL, PROCEDIMENTOS E REAGENTES .....	36
4.1.1 Animais .....	36
4.1.2 Modelo Experimental.....	36
4.1.3 Protocolo de Treinamento.....	37
4.1.4 Determinação da Massa Corpórea e do Tumor.....	38
4.1.5 Suplementação com Óleo de Peixe.....	38
4.1.6 Ortotanásia dos Animais .....	39
4.2 METODOLOGIA PARA ENSAIOS DO TUMOR DE WALKER 256.....	39
4.2.1 Obtenção e Transplante das Células de Tumor de Walker-256.....	39
4.3 ANÁLISES PLASMÁTICAS .....	40
4.3.1 Mensuração da Glicemia.....	40
4.3.2 Mensuração do Lactato .....	40
4.3.3 Mensuração do Triacilglicerol .....	42
4.4 PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	42
4.5 PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA.....	42
4.5.1 Determinação da Quantificação Proteica para Peroxidação Lipídica.....	43
4.6 ELETROFORESE EM GEL - (SDS-PAGE) .....	44
4.6.1 Western Blotting .....	44
4.6.2 Determinação da Quantificação Proteica para Western Blotting .....	45
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	46
<b>5 RESULTADOS</b> .....	<b>47</b>
5.1 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DE CAQUEXIA.....	47
5.1.1 Glicemia.....	47
5.1.2 Lactatemia.....	48
5.1.3 Triacilgliceroemia.....	48
5.2 PARÂMETROS RELATIVOS AO TUMOR DE WALKER 256.....	50
5.2.1 Peso dos tumores.....	50
5.2.2 Peso corpóreo antes e após implantação do tumor .....	50
5.2.3 Proliferação de células tumorais “ <i>ex vivo</i> ” .....	51
5.2.4 Peroxidação Lipídica .....	52

5.2.5 “Western Blotting” de proteínas do tumor de Walker 256 .....	53
5.2.5.1 Expressão de Bcl-2 .....	53
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>55</b>
<b>7 CONCLUSÃO.....</b>	<b>64</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>65</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>86</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento do câncer tem sido observado ao longo da história humana e vários fatores podem contribuir para a disseminação desta doença. Entre os fatores comportamentais, observa-se que o tabagismo, sedentarismo, obesidade, elevado consumo de gorduras saturadas e exposição à radiação ultravioleta contribuem significativamente para o aumento dos casos (ELIZABETH *et al.*, 2009).

Câncer é uma doença genética em que alterações gênicas são transmitidas da célula alterada para as células filhas. Anormalidades nos oncogenes (genes estimuladores da divisão celular), como nos genes supressores tumorais (protetores ou bloqueadores do ciclo celular), conferem as células tumorais vantagens de crescimento e desenvolvimento sobre as células saudáveis (SCULLY; FIELD; TANZAWA, 2000).

O crescimento tumoral pode iniciar de forma espontânea ou provocada por múltiplos agentes químicos, físicos ou biológicos. Em ambos os casos verificam-se alterações mutagênicas, não-mutagênicas ou epigenéticas. A incidência, distribuição geográfica e comportamento de certos tipos de tumores, estão relacionados a múltiplos fatores, incluindo gênero, idade, raça, predisposição genética e exposição a carcinógenos ambientais (INCA, 2002).

Entre os vários fatores que contribuem significativamente para a ocorrência do câncer, estão as alterações na dieta humana que ocorreram no decorrer da evolução humana, principalmente no que se refere ao aumento do consumo de ácidos graxos saturados (FIGURA 1) (SIMOPOULOS, 1999). Porém, muitos tipos de câncer ocorrem sem a contribuição de qualquer determinante evidente, e em alguns desses casos, a predisposição genética na forma de mutação preexistente, pode facilitar a formação da doença (PASTERNAK, 2002).

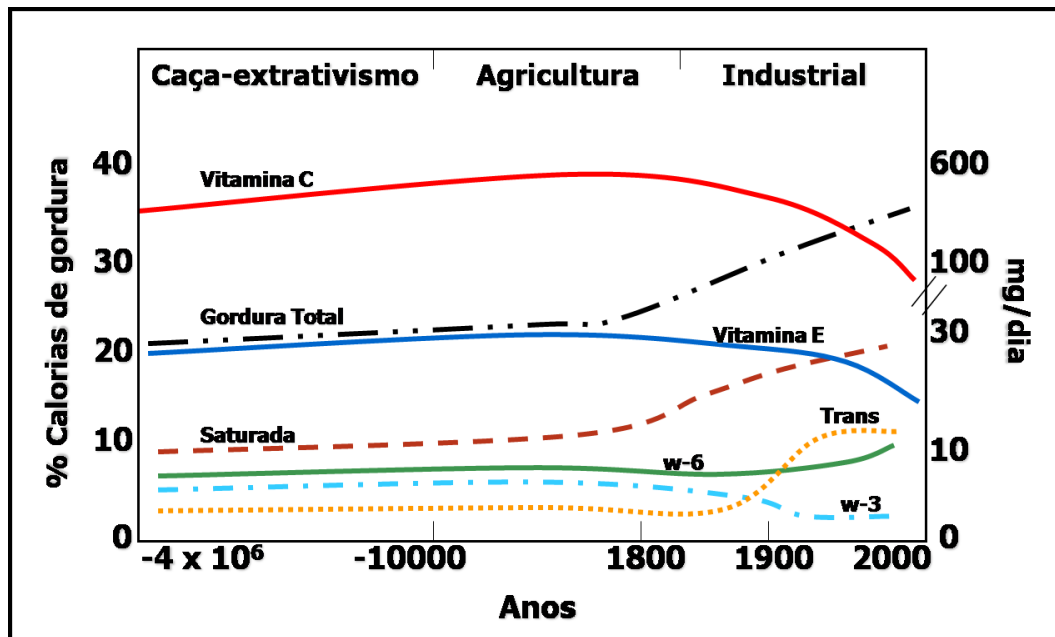


FIGURA 1. Perfil do consumo de gordura e ácidos graxos da espécie humana ao longo dos anos. Adaptada de SIMOPOULOS (1999).

Paciente com câncer pode desenvolver uma síndrome metabólica complexa denominada de caquexia, caracterizada por progressiva perda de peso, anorexia, astenia, anemia, náusea crônica, imunossupressão, depressão, diminuição da capacidade aeróbica, fadiga, diminuição da força muscular e flexibilidade, atrofia muscular e acentuada perda de massa muscular (COURNEYA; FRIEDENREICH, 1997). A perda de peso é uma das características mais evidentes e está essencialmente relacionada com diminuição da massa muscular (CAMPS *et al.*, 2006), que em estágio avançado pode comprometer funções cardíacas e respiratórias (ARGILÉS *et al.*, 1999; TISDALE, 2000). Desta forma, intervenções que preservem a massa muscular têm implicações clínicas importantes em relação a qualidade de vida do paciente com câncer.

Dentre as diversas alternativas terapêuticas no tratamento contra o câncer, a nutrição (enteral e parenteral) foi utilizada inicialmente, com intuito de preservar a massa muscular de indivíduos caquéticos, porém, esta não foi eficaz em demonstrar melhoria ou elevar a sobrevida do paciente caquético, assim como causar redução do crescimento tumoral (BRUERA, 1997). Outras intervenções, por exemplo, o treinamento de força tem demonstrado efeitos benéficos quando administrado para

este tipo de paciente com o objetivo de minimizar a perda progressiva de massa muscular (AL-MAJID; MCCARTHY, 2001b).

O treinamento de força é caracterizado por elevar as taxas de síntese protéica no tecido muscular esquelético (FARRELL *et al.*, 1999) e pode induzir a ganhos significativos de força e massa magra nos indivíduos que o praticam (BARACOS, 2000). Dessa forma, esse tipo de atividade pode ter efeito positivo na manutenção da massa muscular em indivíduos apresentando alto índice de perda de tecido muscular, como portadores de câncer.

O interesse pelos efeitos terapêuticos da prática do treinamento de força no tratamento do câncer e outras doenças vem aumentando gradativamente, decorrente dos efeitos protetores ocasionados pelo exercício físico (FREDENREICH; ORENSTEIN, 2002). O exercício de força também foi demonstrado ter efeitos positivos em doenças crônicas, incluindo, cardiopatias (TAYLOR *et al.*, 2004), hipertensão arterial (PESCATELLO *et al.*, 2004), obesidade (JAKICIC; CLARK; COLEMAN, 2001) diabetes (ALBRIGHT; FRANZ; HORNSBY, 2000), doenças neuromusculares (VUORI, 2001) e câncer (STEVINSON; FOX, 2004).

Estudos anteriores demonstraram que o óleo de peixe, rico em ácidos graxos poliinsaturados n-3 (AGPI n-3) é capaz de reduzir o crescimento tumoral e os sintomas de caquexia em ratos portadores do tumor de Walker 256 (BONATTO *et al.*, 2004; PINTO *et al.*, 2004; PIZATO *et al.*, 2005; MUND *et al.*, 2007), e animais quando submetidos ao protocolo de treinamento de saltos, durante oito semanas, apresentaram redução do crescimento e da taxa de proliferação tumoral (NUNES, 2005; KRYCZYK, 2008). Estudo de MINUZZI (2006) com ratos portadores do tumor de Walker 256 que foram submetidos à protocolo de treinamento de saltos durante 8 semanas associado à suplementação com óleo de peixe, sugeriu que o exercício físico prolonga a sobrevivência dos ratos treinados, diminui a taxa de crescimento tumoral e os sintomas de caquexia. Porém, estes estudos, não abordaram possíveis mecanismos que pudessem explicar estes achados, como por exemplo, a taxa de lipoperoxidação, proliferação das células tumorais, expressão de proteína anti-apoptótica Bcl-2, justificando a realização deste estudo.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 CÂNCER: CAUSAS E ESTIMATIVAS

A Organização Mundial da Saúde (OMS) relata que o câncer é uma das principais causas de morte no mundo, respondendo por 7,6 milhões de mortes no ano de 2008 (Globocan 2008/IARC). Cerca de 30% das mortes por câncer se devem aos cinco principais riscos comportamentais e dietéticos: elevado índice de massa corporal, baixa ingestão de frutas e legumes, falta de atividade física, tabagismo, uso de álcool.

O uso do tabaco é o fator de risco mais importante para o câncer causando 22% das mortes por câncer globais e 71% das mortes por câncer de pulmão globais. A OMS ainda prevê que em 2030, 13,1 milhões de todas as mortes no mundo serão devido ao câncer. Em 2010 no Brasil, foram estimados 236.240 casos novos para o sexo masculino e 253.030 para sexo feminino. O câncer de pele do tipo não melanoma (114 mil casos novos) foi o mais incidente na população brasileira, seguido pelos tumores de próstata (52 mil), mama feminina (49 mil), cólon e reto (28 mil), pulmão (28 mil), estômago (21 mil) e colo do útero (18 mil) (BRASIL, 2009). Estima-se que a incidência do câncer aumentará aproximadamente 45% entre 2007 a 2030 (7.9 a 11.5 milhões de mortes) e boa parte dos casos será influenciado pelo constante crescimento populacional, bem como de seu envelhecimento (OMS, 2008). No Brasil, as estimativas para o ano de 2012 (válidas também para o ano de 2013) apontam a ocorrência de aproximadamente 518.510 casos novos de câncer. Os tipos mais incidentes serão os de pele não melanoma, próstata, pulmão, cólon e reto e estômago para os homens; e os cânceres de pele não melanoma, mama, colo do útero, cólon e reto e glândula tireóide para as mulheres. São esperados um total de 257.870 casos novos para o sexo masculino e 260.640 para o sexo feminino (INCA, 2012).

Apesar da enorme quantidade de pesquisas durante a última década, o câncer continua levando as pessoas à morte em todo o mundo. Ainda de acordo com as estatísticas, o câncer é responsável por cerca de 23% do total de óbitos nos EUA e é a segunda causa de morte mais comum depois da doença de coração (JEMAL *et al*, 2007) Em 2020, estima-se que a população mundial será de 7,5 bilhões. Deste número, cerca de 15 milhões de

novos casos de câncer serão diagnosticados, e 12 milhões de pacientes com câncer morrerão (BRAYAND; MOLLER, 2006).

O desenvolvimento do câncer ocorre quando há falhas nos processos que induzem a divisão celular, defeito no controle do ciclo de divisão celular e/ou desequilíbrio no controle da morte celular programada (apoptose). Em consequência, forma-se massa celular com capacidade ilimitada de crescimento denominada tumor (PASTERNAK, 2002). O desenvolvimento tumoral é um processo complexo que envolve quatro estágios: iniciação, promoção, progressão e disseminação. Cada uma destas etapas pode ser influenciada por fatores ambientais, atuando como ativadores ou inibidores do processo (CURI *et al*, 2002; ALBERTS *et al*, 2010). Estas etapas da carcinogênese são demonstradas na Figura 2, as quais iniciam-se pela ação de agentes carcinogênicos químicos, físicos e/ou biológicos, causando alterações no DNA celular através da ativação de proto-oncogenes e de mutações promotoras de danos oxidativos, reordenamento cromossômico e alterações enzimáticas. Estas alterações genéticas levam à uma explosão clonal seletiva culminando então com a neoplasia.

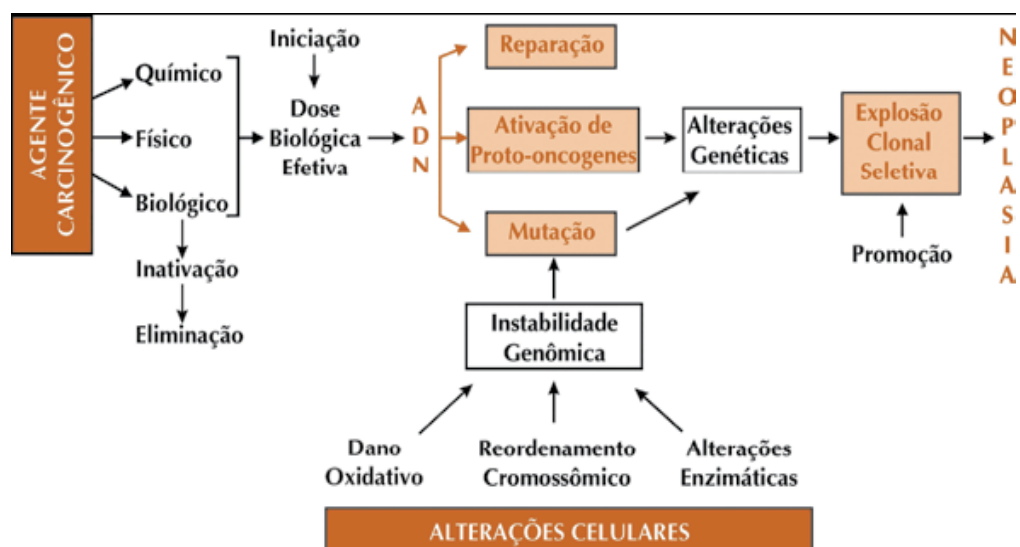


FIGURA 2. As etapas da carcinogênese (INCA, 2002).

Sugere-se que os diversos genótipos da célula tumoral são manifestações de seis alterações fundamentais na fisiologia celular que coletivamente ditam o crescimento maligno: a auto-suficiência em sinais de crescimento, insensibilidade para sinais de crescimento inibitório, evasão da morte celular programada (apoptose),

potencial replicativo ilimitado, angiogênese sustentada, invasão tecidual e metástase. Cada uma destas alterações fisiológicas – novas capacidades adquiridas durante o desenvolvimento do tumor - representa o rompimento de um mecanismo bem sucedido de defesa anticâncer em células e tecidos (HANAHAN; WEINBERG, 2000).

SCHIESSEL (2011) colocou em seu estudo que associações positivas entre fatores ambientais e comportamentais têm sido relatadas para o aumento do risco de câncer pelo menos nos últimos 200 anos. Desta forma a prevenção através das mudanças das atitudes relacionadas aos fatores ambientais são formas de evitar o aumento da incidência e de gastos com o tratamento. Diversos estudos epidemiológicos revelaram que 30-40% da incidência de neoplasias no mundo podem ser atribuídas à dieta (POPKIN, 2007). Conjuntamente, fazem o oposto à busca de hábitos de vida saudável como redução do consumo do álcool e do tabaco, da manutenção de peso corpóreo para nível desejável e do aumento da prática de esporte regularmente (KONTOU *et al.*, 2011).

Estas observações indicam que a maioria dos cânceres, não são de origem hereditária e que os fatores de estilo de vida, tais como hábitos alimentares, tabagismo, consumo de álcool e infecções, têm uma profunda influência sobre seu desenvolvimento (IRIGARAY *et al.*, 2007). Embora os fatores hereditários não possam ser modificados, os fatores de estilo de vida e ambientais são potencialmente modificáveis. A menor influência hereditária do câncer e a natureza modificável dos fatores ambientais apontam para a prevenção do câncer. A importância dos fatores de estilo de vida que afetam a incidência e a mortalidade do câncer incluem tabaco, álcool, dieta, obesidade, agentes infecciosos, os poluentes ambientais, e radiação (ANAND *et al.*, 2008).

## **2.2 MORTE CELULAR**

O mecanismo controlado de morte celular é chamado de apoptose, que é fundamental para a eliminação de células danificadas. Apoptose é o processo de morte celular programado e 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. Tais mudanças celulares ocorrem após uma cascata de sinalização celular e eventos mediados por caspases que regulam proteínas pró e anti-apoptóticas, disparados por dois mecanismos principais: 1) apoptose mediada por receptores (FAS, TNF e TRAIL), caspases e proteínas da família Bcl-2; 2) apoptose envolvendo a mitocôndria, ativação de proteínas Bcl-2, liberação de citocromo c e a formação de apoptossomo (HU; KAVANAGH, 2003).

O conhecimento dos mecanismos de sinalização da morte celular e seus pontos de regulação é essencial para compreender a patogenia das doenças resultantes das alterações destas vias, principalmente, visando a busca por alternativas terapêuticas eficientes (GASPAROTTO, 2009).

Uma variedade de sinais internos e externos regula a expressão de genes que controlam o início da apoptose. A via de sinalização *extrínseca* é iniciada pela ativação dos receptores de morte: FAS (FAS/CD95), TNF R1 e R2 (*tumor necrosis death receptor*), TRAIL (TNF related apoptosis-inducing ligand receptors) R1 (DR4) e R2 (DR5), DD (*death domain*) responsável pela transdução do sinal apoptótico (FIGURA 3) (JIN; EL-DEIRY, 2005; YAN; SHI, 2005). A via de sinalização *intrínseca* pode ser ativada pela irradiação, agentes quimioterápicos, vírus, bactérias e ausência de fatores de crescimento, induzindo a liberação do citocromo C, AIF (*apoptosis-inducing factor*), SMAC/DIABLO (*second mitochondria-derived activator of caspases/direct inhibitor of apoptosis protein*), APAF-1 (*apoptosis protease-activator factor-1*), o qual na presença de ATP/dATP induz a formação do “apoptossomo”. Este medeia a ativação da caspase iniciadora (caspase-9), que consequentemente ativa as caspases executoras (caspases-3, -6 e -7) – responsáveis pela destruição celular característica da apoptose (WANG, 2001; YAN; SHI, 2005) (FIGURA 4).

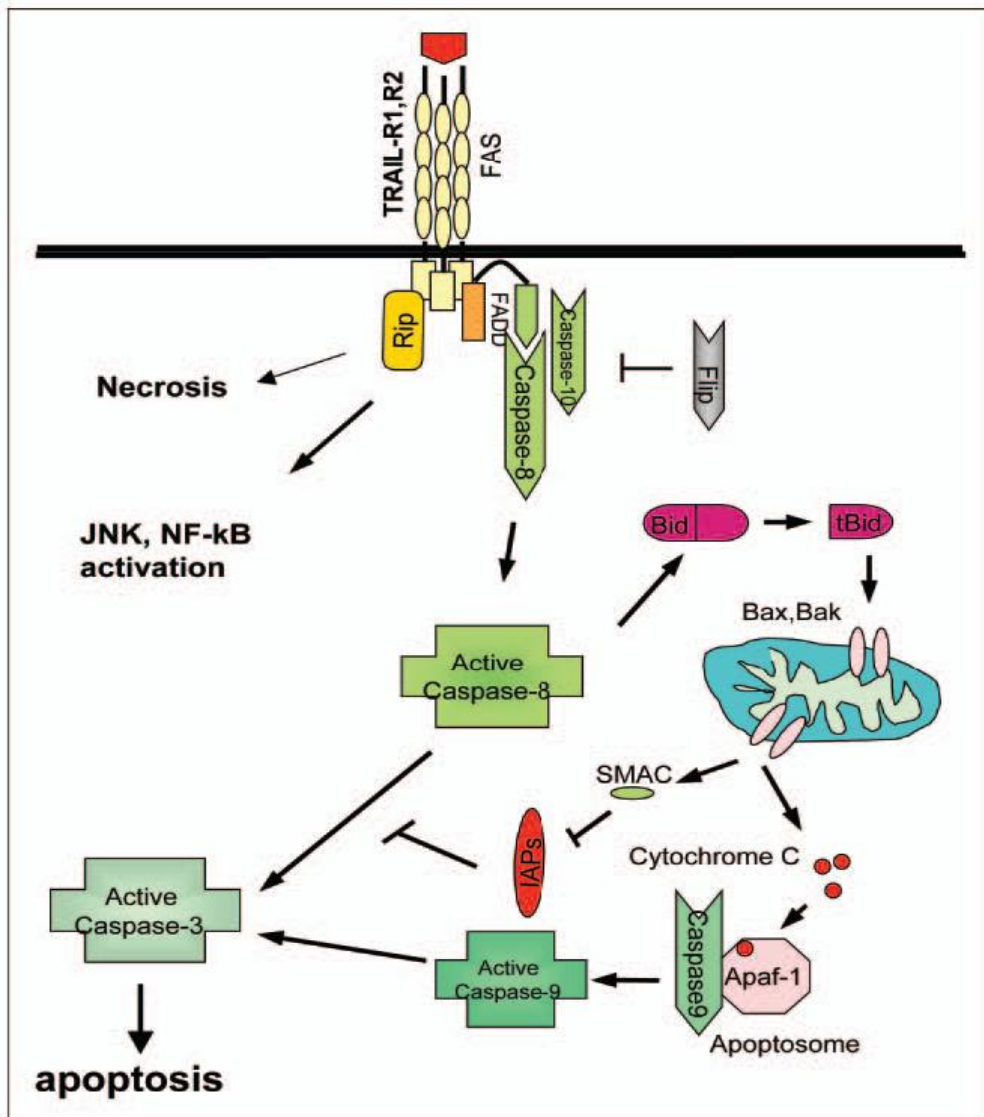


FIGURA 3. Via extrínseca da apoptose celular. Adaptada de JIN; EL-DEIRY (2005).

Alguns genes envolvidos na via intrínseca são expressos pelas proteínas Bax, Fas e p53, as quais iniciam a apoptose, enquanto as proteínas que inibem podem ser exemplificadas pela Bcl-2, Bcl-XL. A morte ou sobrevivência da célula depende da razão entre estes genes expressos. Por exemplo, concentrações elevadas de Bcl-2 em relação à Bax promovem sobrevivência enquanto que a razão inversa promove a morte celular (VOLTARELLI; MELLO; DUARTE, 2008) (FIGURA 4).

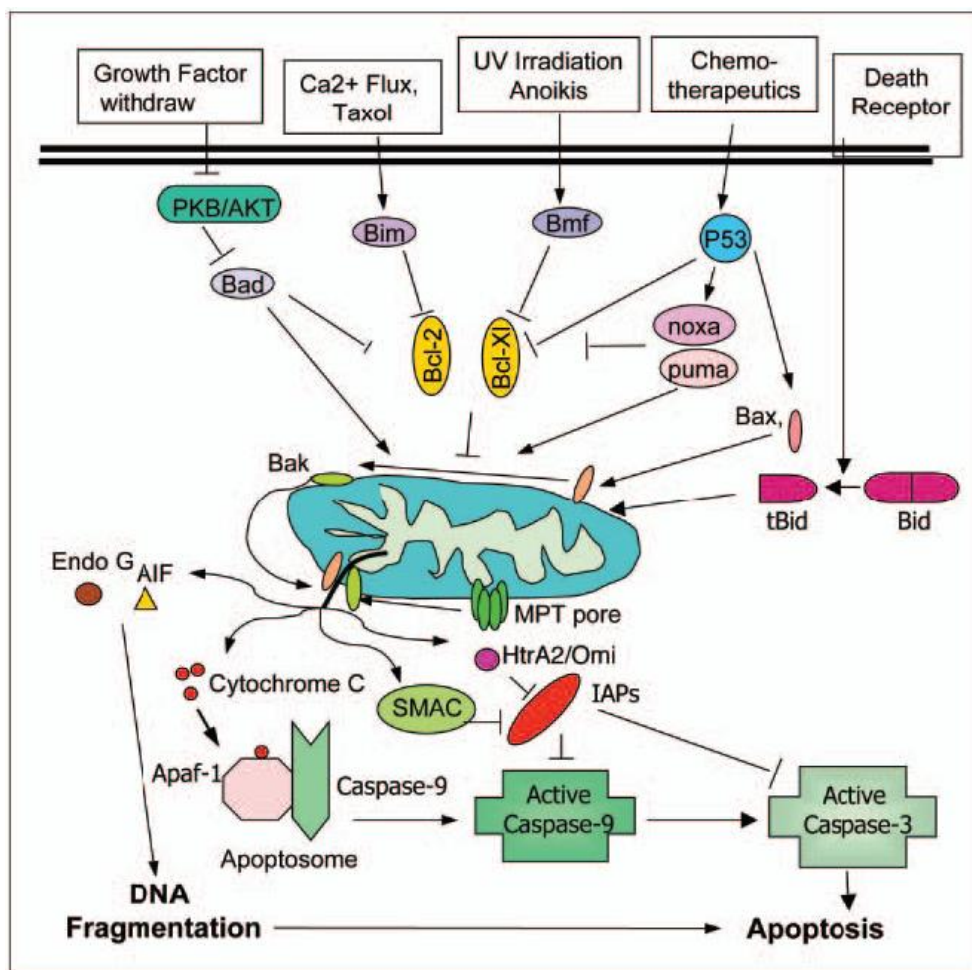


FIGURA 4. Via intrínseca de sinalização mitocondrial da apoptose. Adaptada de JIN; EL-DEIRY (2005).

O gene *bcl-2* (B-Cell-Lymphoma 2) foi descrito inicialmente a partir da translocação t(14:18) que caracteriza cerca de 85% dos linfomas foliculares e cerca de 30% dos linfomas difusos de grandes células. Nessa translocação o segmento 18q21 é justaposto a alguns loci de promotores da cadeia pesada de imunoglobulinas localizado em 14q32, levando à produção de altos níveis de RNAs quiméricos e a superexpressão da proteína BCL-2 (peso molecular 26kDa) (SILVA, 1999). Esta descoberta efetivamente marcou uma nova era na investigação da morte celular. Desde a sua descoberta, há mais de duas décadas, vários membros da família Bcl-2 tem sido identificadas, atuando como agonistas ou antagonistas (REED, 2008).

As proteínas da família Bcl-2 regulam os principais tipos de morte celular, incluindo apoptose, necrose e autofagia. Assim, elas funcionam como ponto nodal para a convergência de múltiplas vias de grande relevância para a biologia e

medicina. Dessa forma, o conceito de que a morte programada de células defeituosas contribui para a malignidade foi estabelecida por estudos da Bcl-2, representando passo importante na compreensão atual da tumorigênese (REED, 2008). A família de genes relacionados a Bcl-2 assume importância no estudo da viabilidade celular nos últimos tempos e desta forma, várias proteínas da família Bcl-2 foram descritas. A primeira destas proteínas identificadas foi a Bax, proteína de 21kD que compartilha homologia com a Bcl-2. Quando Bax foi superexpressa em células, a apoptose em resposta a um sinal de morte foi acelerada, designando a proteína como pró-apoptótica. Ao contrário, quando Bcl-2 foi superexpressa, a morte celular foi suprimida (OLTVAI *et al.*, 1993; YIN; OLTVAI; KORSMEYER, 1994). A proteína p53 é descrita por ativar a transcrição simultânea do gene Bax ligando-se à região de consenso deste e o aumento do seu dímero com Bcl-2 em células normais, sendo este um dos mecanismos pela qual a p53 ativaria a apoptose. Dados recentes sugerem que as proteínas Bcl-2 podem desempenhar papel fundamental na morte celular induzida pelos ácidos graxos n-3. Foi relatado que os tumores de ratos que receberam dieta enriquecida com ácido graxo n-3 tiveram índices mais altos de apoptose quando comparados com aqueles que receberam dieta rica com ácido graxo n-6. Os resultados deste estudo sugeriram que o ácido graxo n-3 reduziu o crescimento do tumor de próstata, retardou a progressão histopatológica e aumentou a sobrevivência de camundongos, enquanto que o ácido graxo n-6 teve efeito oposto (BERQUIN; EDWARDS; CHEN, 2008).

### 2.3 CAQUEXIA

Pacientes com câncer, em estágio avançado em geral, apresentam anorexia, perda de peso, qualidade de vida prejudicada, resposta diminuída ao tratamento quimioterápico e/ou radioterápico e, toxicidade mais freqüente e severa (FOX *et al.*, 2009). Cerca de metade dos pacientes com câncer apresentam esta síndrome, denominada de caquexia, caracterizada pela perda específica de tecido adiposo e massa muscular esquelética (TISDALE, 2004) e demais manifestações clínicas como astenia, fadiga, anemia, saciedade precoce e edema, características comuns de tumores que podem competir com o hospedeiro por nutrientes, promovendo mudanças no metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas (TISDALE, 2001).

Em muitas doenças crônicas, como o câncer, os pacientes morrem devido à instalação deste quadro de catabolismo intenso simultâneo ao crescimento tumoral (MACDONALD *et al.*, 2003; GIACOSA; RONDANELLI, 2008). A perda de peso, uma das características mais evidentes da caquexia, está essencialmente relacionada à diminuição da massa muscular (CAMPS *et al.*, 2006), mudança na utilização dos nutrientes, que pode resultar em aumento da taxa de degradação protéica muscular, com diminuição progressiva da massa corporal magra (evidência clínica de caquexia) (GIACOSA; RONDANELLI, 2008).

Pacientes com perda de peso induzida pelo tumor demonstram queda acentuada na síntese protéica e elevada degradação, a qual é dada pelo aumento na expressão da via proteolítica Ubiquitina-proteossoma ATP dependente. Dessa forma, o músculo esquelético destes pacientes apresenta aumento na expressão mRNA para as subunidades do proteossoma e ubiquitina. Ainda verifica-se aumento na síntese de proteínas da fase aguda (APC) no fígado o qual altera o balanço de aminoácidos para a síntese de proteína muscular, paralelo ao decréscimo na concentração plasmática de aminoácidos de cadeia ramificada, fundamental na manutenção da massa muscular (KUCZERA, 2007).

A fonte principal de energia para tumores sólidos é a glicose, a qual é convertida em lactato e este por sua vez é transportado via sangue para o fígado sendo utilizado para sintetizar novas moléculas de glicose – ciclo de Cori. Este ciclo é responsável pelo gasto energético adicional em pacientes com câncer (300kcal/dia). Dessa forma, tanto o glicerol liberado do tecido adiposo (aumento da lipólise), como os aminoácidos liberados do músculo esquelético (proteólise) são importantes substratos gliconeogênicos (TISDALE, 2002). A caquexia/câncer resulta em aumento da lipólise corporal total em média 50% (JEEVANANDAM *et al.*, 1986; KLEIN; WOLFE, 1990; ZUIJDGEEST-VAN LEEUWEN *et al.*, 2000) e a taxa de proteólise de todo o corpo é aumentada em média 40% (FEARON *et al.*, 1988; MELVILLE *et al.*, 1990; RICHARDS *et al.*, 1993).

O Ciclo de Cori normalmente é responsável por 20% do turnover da glicose, mas em pacientes com câncer sua atividade está aumentada em até 50%, sendo responsável pela geração de 60% do lactato produzido (TISDALE, 2000). A conversão de glicose em lactato nas células tumorais produz duas moléculas de ATP, enquanto a conversão de lactato em glicose no fígado requer seis de ATP (FIGURA 5).

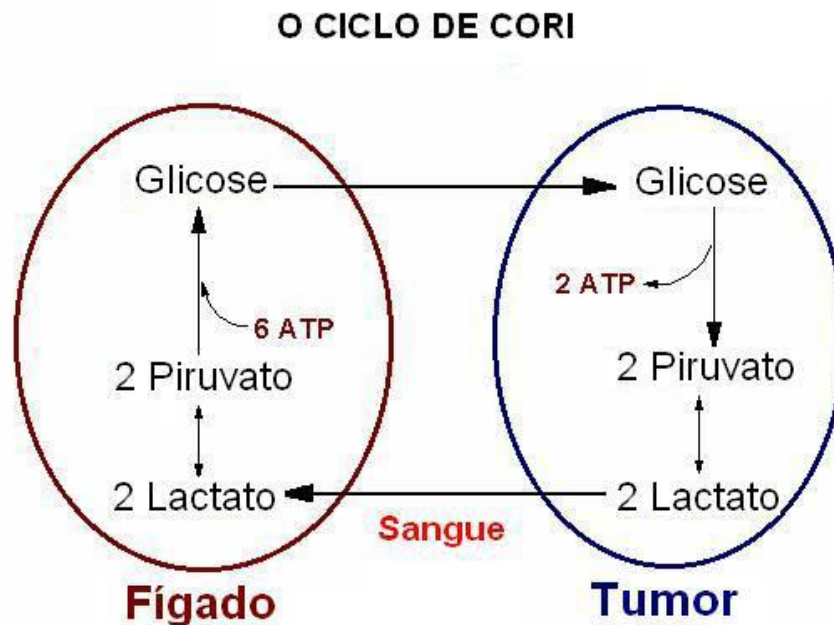


FIGURA 5. Ciclo de Cori. Adaptado de M. W. King (1996).

Os mecanismos envolvidos na perda de tecido muscular induzido pelo tumor não são completamente conhecidos. Estudos evidenciam que a ativação de citocinas pró-inflamatórias e vias proteolíticas nas células musculares envolvidas neste processo (TISDALE, 2000), levam às alterações no metabolismo protéico muscular ocasionando excessiva degradação protéica em relação a síntese protéica, resultando em balanço nitrogenado negativo (AL-MAJID; MCCARTHY, 2001a).

Três principais vias de proteólise são responsáveis pelo catabolismo das proteínas musculares: sistema lisossomal, calpaínas citoplasmáticas cálcio-dependentes e a via ubiquitina-proteosoma dependente de ATP, esta última é considerada a mais importante para a degradação das proteínas nos estados catabólicos, como, inanição, septicemia, acidose metabólica, trauma grave e caquexia neoplásica (BARACOS, 2000; TISDALE, 2002; GLASS, 2003). O sistema ubiquitina-proteosoma dependente de ATP é responsável pela perda de músculo esquelético em camundongos caquéticos, conforme demonstrado no estudo de LORITE *et al.* (1998). TISDALE (2000) descreve que, neste sistema, proteínas são marcadas para degradação pela ligação com a ubiquitina (peptídeo formado por 76 aminoácidos), a qual requer a ação de três enzimas: enzima de ativação (E1), enzimas

de conjugação/carreadoras (E2) e enzimas de conjugação (E3). A proteína poliubiquitinada é degradada em um complexo formado por multisubunidades: o proteossoma 26S. Este libera pequenos oligopeptídeos contendo de 6 a 9 resíduos de aminoácidos que são rapidamente degradados pelas peptidases citosólicas (FIGURA 6).

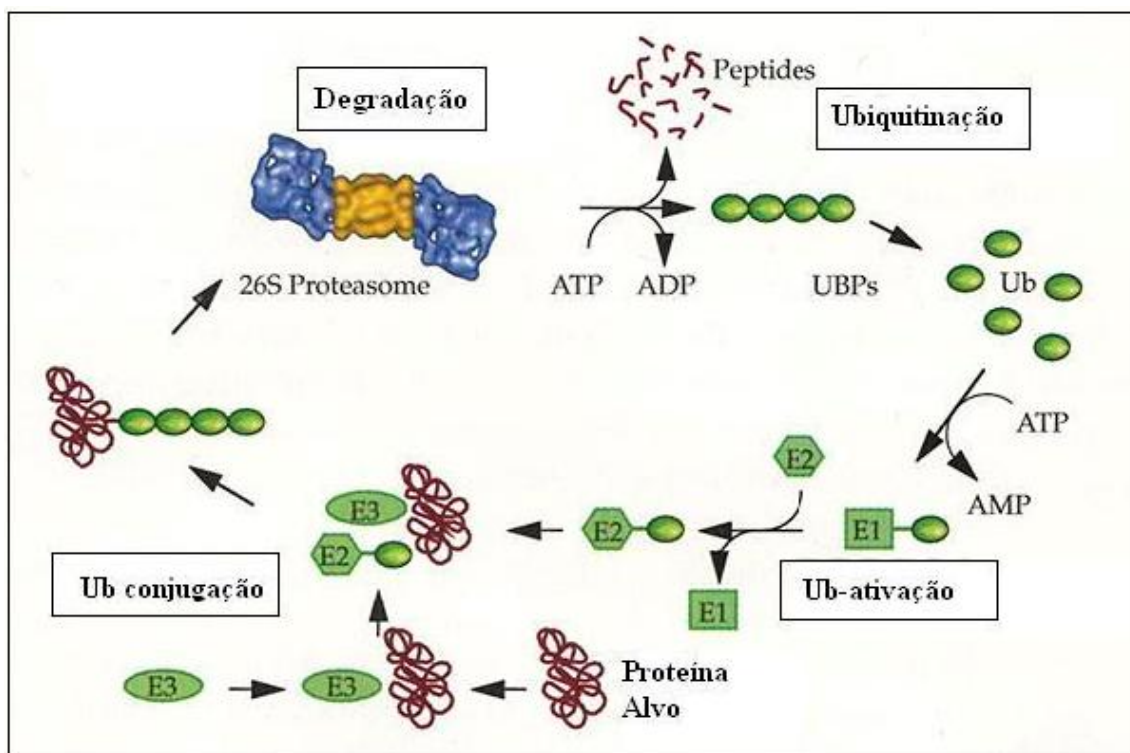


FIGURA 6. Sistema proteossoma ubiquitina-ATP dependente. Adaptada de PESSINI (2007).

A regulação do sistema ubiquitina-proteossoma no músculo esquelético durante a caquexia parece ser induzida por fatores tumorais ou do hospedeiro, responsáveis pela manutenção da caquexia. A expressão do proteossoma é aumentada em função da diminuição das concentrações celulares da proteína miofibrilar miosina pela ação do fator de indução de proteólise (PIF) (TISDALE, 2004), fator este que induz diretamente a proteólise e a lipólise, inibindo a captação de glicose pelo músculo esquelético, levando a resistência à insulina (ARGILÉS *et al.*, 2003). PIF induz a degradação da proteína no músculo esquelético, por indução da via proteolítica ubiquitina-proteossoma, que é considerado ser o principal mecanismo pelo qual as proteínas são degradadas no músculo esquelético (GOMES-MARCONDES *et al.*, 2002). Os resultados de estudos mostram que PIF inibe a síntese protéica e induz a

degradação da proteína no músculo esquelético através de um único passo: a ativação da proteína quinase dependente de RNA (PKR) (ELEY; TISDALE, 2007). Ativação da PKR também leva à ativação do fator de transcrição NF-kB, responsável pelo aumento da expressão de grandes componentes da via da ubiquitina-proteossoma. O PIF pode agir isoladamente ou em conjunto com o hospedeiro ou com as citocinas derivadas do tumor para produzir um estado caquético (FUJIKI *et al.*, 1997). Ambas análises bioquímicas e histológicas sustentam a noção que os tumores são a fonte de PIF (CABAL-MANZANO *et al.*, 2001; TODOROV; FIELD; TISDALE, 1999).

Interesse adicional em relação à caquexia no câncer vem da experiência de BOSSOLA *et al.* (2003), os quais demonstraram a superexpressão de mRNA para a ubiquitina e atividade proteolítica aumentada do proteossoma antes da perda de peso de pacientes com câncer. Esta experiência permitiu a abertura de nova área de pesquisa no domínio da intervenção precoce e de prevenção da perda de peso induzida pelo crescimento tumoral (GIACOSA; RONDANELLI, 2008).

A caquexia é considerada um evento multifatorial e sua patogênese metabólica é demonstrada no diagrama abaixo adaptado de GIACOSA; RONDANELLI (2008), o qual demonstra duas vias comuns de ação da caquexia. Por um lado, estudos têm demonstrado que uma variedade de citocinas pró-inflamatórias podem levar diretamente ao desenvolvimento de anorexia e alterações metabólicas que pode ser associado com o desenvolvimento de caquexia. Esta presença de resposta pró-inflamatória tem sido associada a uma variedade de tumores humanos, com perda acelerada de peso, anorexia, hipermetabolismo e duração menor de sobrevivência. De outro lado, estudos associados com a ação do fator de indução de proteólise (PIF) (TISDALE, 2004) o qual induz diretamente a perda da massa corporal magra e agravando a perda de peso corporal.

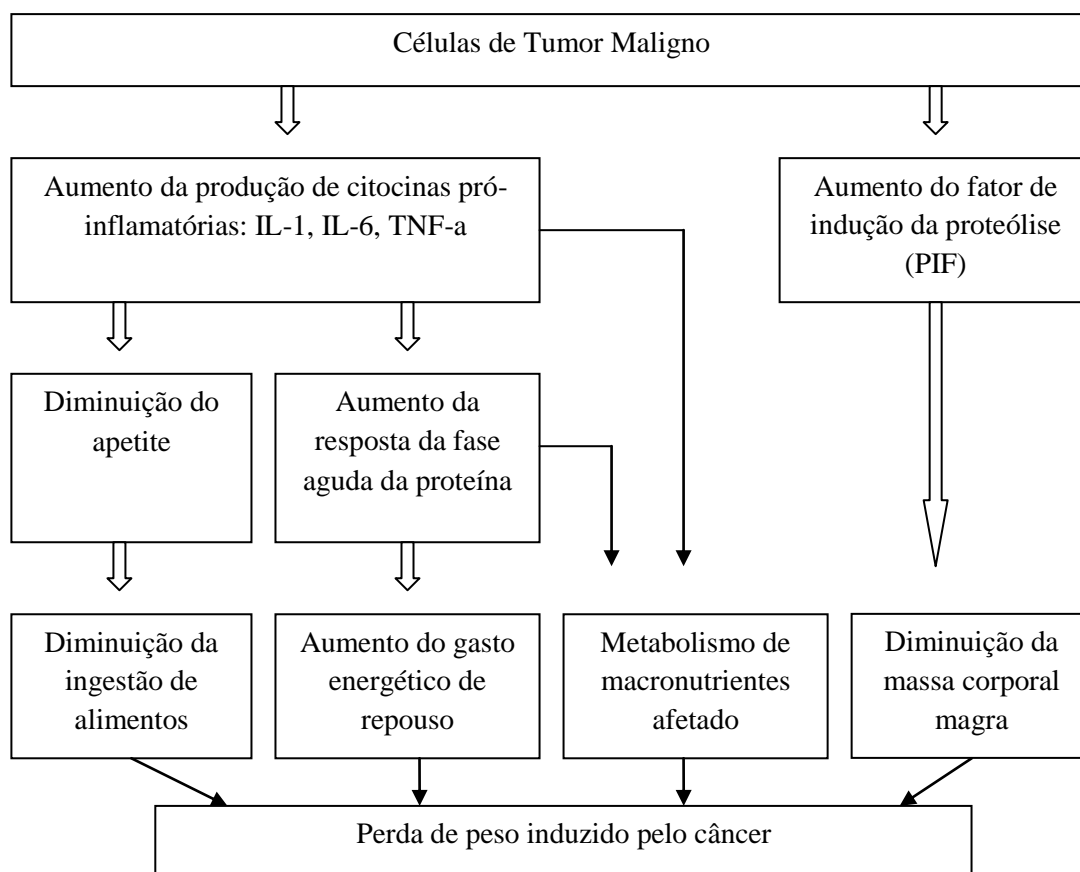


FIGURA 7. Patogênese metabólica da caquexia. Adaptada de GIACOSA; RONDANELLI (2008).

## 2.4 CÂNCER E EXERCÍCIO

O exercício tem sido amplamente adotado como auxiliar preventivo ou terapêutico para o tratamento de várias condições fisiológicas (ROSA, 2004).

Nos últimos anos, aumentou o interesse a respeito do exercício físico como parte do tratamento e reabilitação dos indivíduos com câncer. Embora os efeitos do exercício físico em pacientes com câncer não sejam totalmente conhecidos, sabe-se que a atividade física pode melhorar o prognóstico através dos efeitos benéficos nos biomarcadores do câncer e equilíbrio energético, bem como diminuir o risco para doença cardiovascular, importante causa de morte para muitos sobreviventes do câncer (VALENTI *et al.*, 2008).

Por muitos anos a recomendação médica para pacientes com câncer era o repouso, evitando assim esforços físicos. Esta orientação era prescrita de forma empírica, porque a doença e seu tratamento estavam associados com mudanças

funcionais que resultavam em menor desempenho físico e o exercício poderia potencializar sintomas como fadiga, falta de ar e taquicardia. Porém, a inatividade física gera perda de massa muscular e da capacidade cardiorespiratória. Estudos realizados nos últimos anos esclareceram conceitos relacionados ao exercício físico, fadiga em pacientes com câncer. Informações advindas desses estudos mostraram que o exercício pode diminuir o quadro de fadiga em pacientes com câncer durante e após o tratamento. Estes resultados estão relacionados aos ganhos adaptáveis do exercício físico, como aumento de massa muscular, melhora no sistema cardiorespiratório e maior concentração de enzimas oxidativas no músculo. Pacientes com câncer que participaram de programas de exercícios físicos mantiveram melhores níveis da condição física e sofreram menos angústia psicológica, fadiga e outros sintomas relacionados ao tratamento durante a quimioterapia ou radioterapia (SEGAL *et al.*, 2001).

O exercício é capaz de atenuar a perda de massa muscular induzida pela síndrome da caquexia e de aumentar a sobrevivência de roedores inoculados com tumor (AL-MAJID; McCARTHY, 2001b). O exercício físico foi capaz de promover efeitos benéficos para a síntese protéica e promover a redução da concentração de cortisol (importante indutor de proteólise), preservando assim os níveis de massa muscular do indivíduo, mesmo com a presença do tumor em constante competição com o organismo por nutrientes (DANERYD *et al.*, 1995). Além de preservar a massa muscular, o exercício proporciona, aos pacientes com câncer que utilizam dessa prática, aumento no consumo máximo de oxigênio (MAcVICAR; WINNINGHAM; NICKEL, 1989) redução na sensação de náuseas (WINNINGHAM & McVICAR, 1988), diminuição no percentual de gordura corporal e melhora na qualidade de vida (BURNHAM; WILCOX, 2002).

Há inúmeras evidências sugerindo que o exercício físico regular pode reduzir a incidência de vários cânceres. Estilo de vida sedentário tem sido associado com muitas doenças crônicas, como o aumento do risco de câncer de mama, cólon, pâncreas, próstata e de melanoma (BOOTH *et al.*, 2002). Além disso, homens com baixo nível de atividade física e mulheres com maior índice de massa corporal são mais suscetíveis a ter mutação Ki-ras em seus tumores, o qual ocorre em 30-50% dos cânceres de cólon. Redução de cerca de 50% na incidência de câncer do cólon foi observada entre aqueles com os mais altos níveis de atividade física (COLDITZ; CANNUSCIO;

FRAZIER, 1997). A falta de exercício resultou em níveis mais altos de testosterona, IGF-1 e imunidade suprimida, os quais podem aumentar incidência de câncer de próstata. Um estudo indicou que homens sedentários tiveram 56% e as mulheres 72% de maior incidência de melanoma do que àqueles que se exercitavam 5-7 dias por semana (SHORS *et al.*, 2001).

Diante das evidências expostas, o exercício físico demonstra imenso potencial em várias condições o que parece ser correlacionado com o fato de que este promove adaptações em todos os sistemas do organismo (COSTA ROSA, 2004).

O exercício físico é uma das estratégias adotadas para neutralizar o desperdício de proteína durante as doenças crônicas. Além deste impacto positivo do exercício no metabolismo das proteínas, estudos propõem que a ação do exercício regula o eixo neuroimunoendócrino, aumentando a sobrevivência e melhorando a qualidade de vida (ZINNA; YARASHESKI, 2003).

LEUNG *et al.* (2004) demonstraram que o soro obtido a partir de pacientes que foram submetidos a programas de exercício reduziu o crescimento de células tumorais em indivíduos com câncer de próstata LNCaP em 27%, através de um aumento da expressão da proteína p53 (ROSA, 2004). Em modelos animais, os benefícios promovidos pelo exercício físico incluem a inibição do tumor (BARACOS, 1989), diminuição da taxa de crescimento tumoral e do aparecimento de metástases (NUNES, 2005), efeito anticaquético (MINUZZI, 2006), favorecimento do balanço pró-apoptótico (KRYCZYK, 2008).

Em estudo de SIU *et al.* (2004) foi investigado o efeito da atividade física moderada e regular sobre a apoptose em músculo sóleo de ratos submetidos ou não ao treinamento em esteira rolante, durante 8 semanas (5 dias/semana). Os autores observaram que, quando comparado o músculo sóleo dos animais treinados dos não-treinados, houve aumento da expressão de Bcl-2, diminuição da expressão do fator ativador de apoptose (Apaf-1) e diminuição dos níveis de mRNA/BAX, o que sugere que o treinamento físico moderado pode atenuar a extensão da apoptose na musculatura esquelética. CAI *et al.* (2006) após investigação em ratos sobre o efeito do exercício em esteira rolante realizado em diferentes intensidades (músculo gastrocnêmio), verificaram que a apoptose foi observada somente nos músculos dos animais submetidos às intensidades moderada e intensa, alcançando os níveis mais elevados após a realização do exercício, apenas no grupo de animais que efetuou

exercício intenso. Os pesquisadores concluíram que o exercício pode evocar a apoptose e acelerar a depuração de células apoptóticas, e o desequilíbrio entre estes dois eventos durante o exercício pode contribuir para a injúria da musculatura esquelética.

Dentre os tipos de exercícios descritos, LUCIA; EARNEST; PEREZ (2003) colocam que o treinamento de força é importante componente de qualquer programa de treinamento de pessoas saudáveis. De acordo com o *American College of Sports Medicine - ACSM* (2002), 6-7 semanas de treinamento de força são suficientes para obter resultados mensuráveis de hipertrofia muscular.

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

Apesar destes resultados emergentes, os programas de exercícios não são bem definidos, nem incluídos na lista de possíveis intervenções para a gestão dos sintomas do câncer (ROSA, 2004).

## **2.5 CÂNCER E ÁCIDOS GRAXOS**

Nos últimos 25 anos houve aumento da aplicação de conceitos da biologia molecular para estudos de componentes alimentares e nutrientes essenciais como fatores no controle da expressão gênica. Os genes definem a susceptibilidade a uma doença ou condição, e os fatores ambientais, como dieta e exercício, determinam quem entre os indivíduos suscetíveis desenvolverão a doença. Dentre estes fatores, a nutrição é considerada fator ambiental de grande importância (SIMOPOULOS, 2010).

Humanos em geral, consomem pelo menos 20 tipos diferentes de ácidos graxos, que são classificados como saturados, monoinsaturados e poliinsaturados.

Assim, a dieta humana contém mistura complexa de óleos e gorduras, cujos componentes estruturais básicos são os ácidos graxos. Os ácidos graxos têm muitos destinos no corpo, incluindo a  $\beta$ -oxidação para energia, o armazenamento em depósito de gordura ou incorporação nos fosfolipídeos de membrana (SURETTE, 2008). Ácidos Graxos (AGs) provém da alimentação na forma de triacilgliceróis (TAGs) e são armazenados para reserva energética e metabólica (FAGUNDES, 2002). A estrutura geral dos AGs é uma cadeia de hidrocarbonetos com um grupo carboxila (COOH) numa extremidade e um metila (H<sub>3</sub>C) na outra. Quando o ácido graxo contém apenas simples ligação entre as ligações de carbono ele é denominado de ácido graxo saturado (AGS), o qual pode ser classificado de acordo com 4 diferentes tamanhos da cadeia carbônica: a) ácidos graxos de cadeia curta (3 a 7 carbonos); b) ácidos graxos de cadeia média (8 a 13 carbonos); c) ácidos graxos de cadeia longa (14 a 20 carbonos) e d) ácidos graxos de cadeia muito longa (acima de 21 carbonos) Os AGs contendo uma ou mais ligações duplas na cadeia são denominados de ácidos graxos insaturados (AGI). Quando o ácido graxo contém uma ligação dupla, é chamado 'monoinsaturado' (AGMI). Se tiver mais de uma dupla ligação, é chamado de 'poliinsaturado' (AGPI). Em quase todos os ácidos graxos insaturados que ocorrem naturalmente, as duplas ligações estão na configuração *cis* e normalmente quando posicionadas em relação ao átomo de carbono do grupo metila dão origem às famílias n-3, n-6 e n-9 (RATNAYAKE; GALLI, 2009).

O parental (precursor) dos ácidos graxos da família n-3 é o ácido graxo  $\alpha$ -linolênico (ALA) (18:3 n-3), presente nos vegetais verdes folhosos e em diferentes quantidades nos óleos de soja (8%), canola (11%), linhaça (57%). Ácidos graxos n-3 de cadeia longa, principalmente o ácido graxo eicosapentaenóico (EPA) (20:5 n-3) e ácido graxo docosahexaenóico (DHA) (22:6 n-3), são encontrados em peixes marinhos de águas geladas como a cavala, o salmão, sardinha, arenque, dourado; truta arco íris e os seus óleos que contém aproximadamente 60% de EPA e DHA (Figura 8) (HARDMAN, 2004; McCUSKER; GRANT-KELS, 2010).

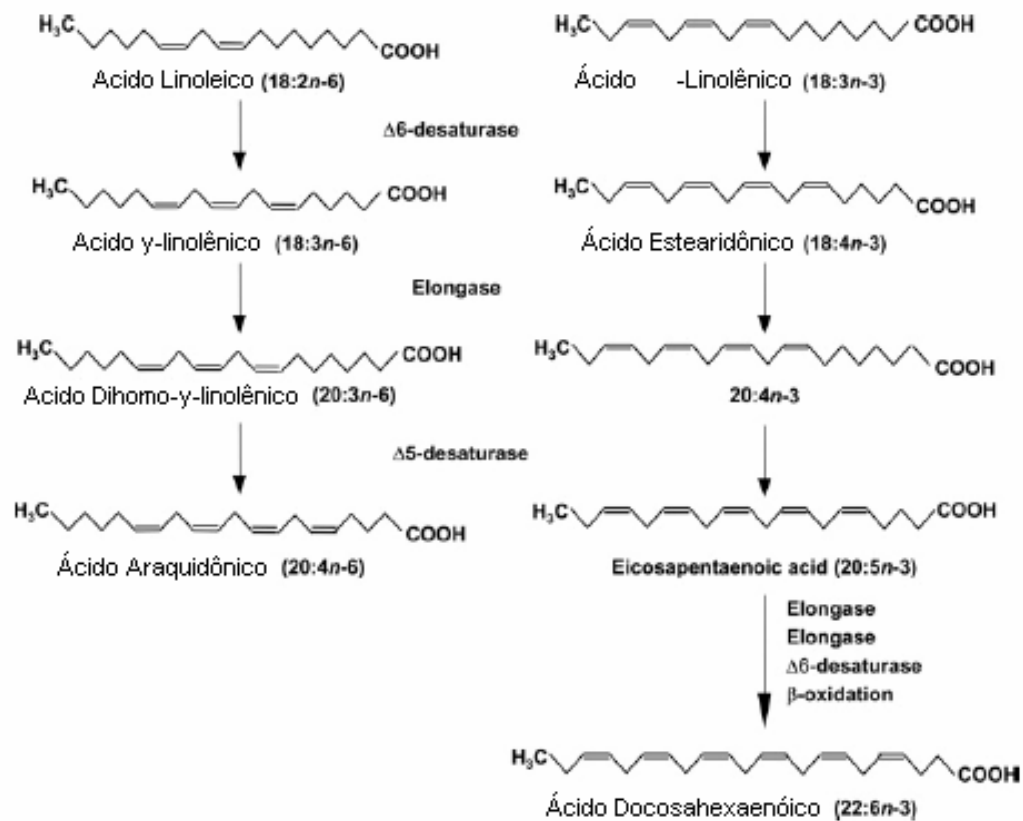


FIGURA 8. Estrutura e metabolismo dos AGPIs n-6 e n-3. Adaptada de Calder (2005).

Atualmente, a dieta ocidental contém quantidade desproporcionalmente elevada de n-6 e baixa quantidade de n-3, e esta consequente razão de n-6:n-3 é investigada por contribuir em doenças cardiovasculares, inflamação e câncer. Especificamente quanto a relação entre o consumo de gorduras na dieta e o câncer tem sido demonstrada, por exemplo, nas populações de esquimós, que consomem dietas ricas em AGPI n-3 e apresentam baixa incidência de câncer além de outras doenças, como as inflamatórias (KROMANN; GREEN, 1980).

Estudos em populações humanas associaram o alto consumo de peixe ou óleo de peixe à redução do risco de câncer de cólon, próstata e mama, embora outros estudos não encontraram associação significativa. No entanto, as evidências epidemiológicas, combinada com os efeitos demonstrados de AGPIs n-3 sobre o câncer em animais e modelos de cultura celular, tem motivado o desenvolvimento de intervenções clínicas usando n-3 na prevenção e tratamento do câncer, bem como para

suporte nutricional dos pacientes com câncer para reduzir a perda de peso e modular o sistema imunológico (BERQUIN; EDWARDS; CHEN, 2008). Estudos realizados nos últimos 30 anos, confirmam que os AGPI n-3, principalmente o ácido eicosapentaenóico (EPA) e docosaexaenóico (DHA), promovem a ação de agentes anticarcinogênicos e atuam como agente anticancerígeno (SIMOPOULOS, 2003; MAZZOTTA; JENEY, 2008; RIEDIGER *et al.*, 2009; SIMOPOULOS, 2010).

GIACOSA; RONDANELLI (2008) em estudo com indivíduos saudáveis e em pacientes com câncer, sugeriram que a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-1 e TNF) podem ser *down-regulated* pelos AGPIs n-3, em particular o ácido eicosapentaenóico (EPA). Além disso, os efeitos do fator de indução de proteólise (PIF), fator caquético produzido pelo tecido do câncer, também podem ser inibidos pelo EPA.

As vias de sinalização que são relevantes para a carcinogênese e a progressão do tumor são afetadas de formas diferentes por AGPIs n-3 e n-6. N-6 é relatado *up-regulate*, ativa mediadores de sinalização celular, incluindo proteína quinase C, ras, ERK 1/2 e NF-κB. Por sua vez o n-3 tem efeito oposto (BERQUIN; EDWARDS; CHEN, 2008).

Em estudo de BERQUIN *et al.* (2007), que determinaram a influência dos ácidos graxos no risco de câncer de próstata em ratos com lesão genética definida, foi encontrado que o AGPI n-3 reduziu o crescimento do câncer de próstata, amenizou a progressão histopatológica e aumentou a sobrevivência, enquanto que o AGPI n-6 gerou resultados opostos. HALL *et al.* (2008) investigaram que a associação entre a ingestão de AGPI n-3 e o aparecimento de câncer colorretal em homens é inversamente proporcional. Experimentos em animais sugerem que o ácido graxo n-6 aumenta o risco de certos cânceres, enquanto o de ácido graxo n-3 diminui estes riscos. No entanto, nem todos os estudos obtiveram resultados consistentes (SIMOPOULOS, 2010).

Uma vez que exercício provoca ações anti-tumorais e que AGPI n-3 também evoca estes efeitos, estudos que expandam o conhecimento de como isto ocorre são fundamentais.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Investigar o efeito do treinamento de salto associado à suplementação com óleo de peixe sobre os parâmetros de caquexia, crescimento tumoral e vias de sinalização celular em ratos.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Mensurar a massa corpórea dos animais e do tumor;
- Mensurar as concentrações plasmáticas de glicose, lactato e triacilglicerol;
- Determinar a proliferação das células tumorais *ex vivo* pela incorporação de [2-<sup>14</sup>C]- timidina em DNA;
- Mensurar a lipoperoxidação em células tumorais;
- Determinar a expressão da proteína Bcl-2, envolvida em processo apoptótico.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 MODELO EXPERIMENTAL, PROCEDIMENTOS E REAGENTES**

#### **4.1.1 Animais**

Para a realização deste estudo foram utilizados ratos albinos adultos (70 dias) da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), obtidos do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Metabolismo Celular no Departamento de Fisiologia do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA), do Setor de Ciências Biológicas (SCB), da Universidade Federal do Paraná – UFPR, certificado nº 445 (ANEXO I).

#### **4.1.2 Modelo Experimental**

Os animais foram mantidos em ciclo claro/escuro (12/12 horas), com temperatura controlada de  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ , com livre acesso a água e alimento (Nuvilab-Nuvital) composto por 66% de carboidratos, 23% de proteínas, 4% de lipídios, 6% de fibras e 1% de vitaminas e minerais. Foram divididos aleatoriamente em 8 grupos (n=10 animais/grupo): Sedentário sem suplementação (S), Sedentário suplementado com óleo de peixe (SO), Sedentário portador de tumor (SW), Sedentário portador de tumor suplementado com óleo de peixe (SWO), Exercitado sem suplementação (EX), Exercitado suplementado com óleo de peixe (EXO), Exercitado portador de tumor (EXW), Exercitado portador de tumor e suplementado com óleo de peixe (EXWO) (TABELA 1). Após seis semanas de treinamento de saltos, 1ml de solução contendo  $3 \times 10^7$  células do tumor ascítico de Walker 256 foi inoculada subcutaneamente no flanco direito dos animais identificados como portadores do tumor. Após 15 dias da

inoculação do tumor, coincidindo com a oitava semana de treinamento, os animais foram ortotansados.

TABELA 1. Divisão dos grupos (n=10 animais/grupo).

<b>Grupo</b>	<b>Tratamento</b>
S	Sedentário sem suplementação
SO	Sedentário suplementado com óleo de peixe
SW	Sedentário portador de tumor
SWO	Sedentário portador de tumor suplementado com óleo de peixe
EX	Exercitado sem suplementação
EXO	Exercitado suplementado com óleo de peixe
EXW	Exercitado portador de tumor
EXWO	Exercitado portador de tumor suplementado com óleo de peixe

#### **4.1.3 Protocolo de Treinamento**

Na primeira semana de treinamento, os animais dos grupos exercitados, realizaram uma adaptação ao meio líquido (30 minutos de natação por dia) nos 3 primeiros dias, sem utilização de carga. Nos dois dias subsequentes, os animais realizaram programa de treinamento físico, constituído de 10 séries de saltos em tanque com água, cuja temperatura foi mantida a  $32 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , com sobrecarga

equivalente à 30% do peso corporal de cada animal, acoplada ao tórax. Na segunda semana, os animais realizaram o mesmo programa de treinamento com sobrecarga equivalente à 40% do peso corporal de cada animal e a partir da terceira semana até a última, os animais realizaram o mesmo programa de treinamento com sobrecarga equivalente à 50% do peso corporal de cada animal (atualizada semanalmente).

A sessão de treinamento consistiu de 10 séries de saltos com duração de 30 segundos e com intervalo de 1 minuto entre cada série. Foram feitas 4 sessões semanais de treinamento, com descanso nas quarta-feiras e fins de semana, durante o período de 8 semanas. Após a inoculação das células tumorais, na sexta semana, não houve aumento da carga de acordo com o peso corporal e o treinamento continuou por mais 2 semanas. Os saltos foram realizados em tubo de PVC com 250 mm de diâmetro, visando limitar a alternativa do animal em seguir para outra direção, favorecendo desta forma o salto. A profundidade da água foi correspondente a 150% do comprimento corporal do rato (adaptado de ROGATTO; LUCIANO, 2001). Este protocolo de treinamento foi o mesmo utilizado por estudos anteriores (NUNES, 2005; MINUZZI, 2006; LIMA, 2007; KRYCZYK, 2008) do Laboratório de Metabolismo Celular – UFPR.

#### **4.1.4 Determinação da Massa Corpórea e do Tumor**

No decorrer do experimento, a massa corpórea dos animais foi monitorada duas vezes por semana (segundas-feiras e quartas-feiras) no período da manhã, sempre antes do treinamento, em uma balança (Urano UDI 10000/1). Após a ortotanásia, o tumor foi retirado e pesado em balança digital (Denver Instrument XL-410).

#### **4.1.5 Suplementação com Óleo de Peixe**

A suplementação com óleo de peixe foi realizada durante todo o período de treinamento, sendo diária e realizada logo após a sessão de treinamento, via oral através de micropipeta. A dose utilizada foi equivalente 1g/kg de peso corporal-1. dia-1 durante o todo o período de treinamento. O óleo de peixe utilizado foi doado pela

Fundação Herbarium®. As cápsulas contêm 1g de óleo de peixe na proporção de 0,192g (19,1%) de EPA e 0,124 (13,4%) de DHA.

#### **4.1.6 Ortotanásia dos Animais**

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

## **4.2 METODOLOGIA PARA ENSAIOS DO TUMOR DE WALKER 256**

### **4.2.1 Obtenção e Transplante das Células de Tumor de Walker-256**

Um dos modelos experimentais mais utilizados em ratos Wistar é o Tumor de Walker 256. Este tumor foi identificado por George Walker em 1928, no John's Hopkins University School of Medicine, em glândulas mamárias de uma rata preña. O tumor de Walker 256 é caracterizado como carcinossarcoma apresentando dois subtipos: tipo A, metastizante 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 a partir do 15º dia. Desde sua descoberta em 1928, essa linhagem tumoral tem sido amplamente utilizada em estudos antineoplásicos e de caquexia induzida pelo tumor, por ser espécie-específica para ratos e facilmente transplantada (FERNANDES, 1995). Neste experimento foram utilizados matrizes com o tumor de Walker 256, tipo B, cedidos pelo Professor Rui Curi, USP em 1989 e, desde então mantidos pelo Laboratório de Metabolismo Celular da UFPR.

Suspensão de  $2 \times 10^7$  células/mL de tumor de Walker 256, foi injetada intraperitonealmente em um rato da linhagem Wistar. Após aproximadamente 5 dias, quando constatada ascite, o animal foi ortotansiado e foi injetado 10mL de solução

salina 0,9% em sua cavidade abdominal. Seu abdômen foi massageado e por laparotomia mediana foi retirado da cavidade abdominal o fluido contendo as células tumorais, com auxílio de pipeta, tipo Pasteur, de plástico. Foi realizada a contagem do número de células tumorais em câmara de Neubauer, na presença de azul de trypan, 10g/L em solução salina 0,9% (NaCl 154mM). Após a contagem,  $3 \times 10^7$  células (1mL de solução) foram inoculadas subcutaneamente no flanco direito dos animais em experimentação na sexta semana de treinamento.

### **4.3 ANÁLISES PLASMÁTICAS**

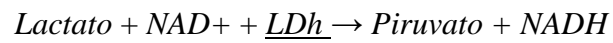
#### **4.3.1 Mensuração da Glicemia**

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

#### **4.3.2 Mensuração do Lactato**

Foi mensurado pelo método enzimático, segundo ENGLE; JONES (1978). Inicialmente foi feita a desproteinização do soro, pela adição de 50  $\mu$ L de ácido tricloroacético (TCA a 25%) a 0,5 mL da amostra e a mistura foi agitada em vórtex, centrifugada por 1 minuto a 13.000 rpm em centrífuga Eppendorf modelo 5810R. Em seguida, foi coletado 200  $\mu$ L do sobrenadante e adicionou-se 4  $\mu$ L de indicador universal para permitir a visualização da neutralização do soro, pela adição de KOH/TRIS (0,5 M/2 M), sinalizada pela coloração verde, indicando pH 7,0. Deste volume neutralizado pipetou-se 100  $\mu$ L em tubos de ensaio contendo 1 mL do tampão do ensaio (descrito abaixo) e, após 45 minutos, foi feita leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda 340 nm (Pharmacia 4300 Pro). O princípio dessa mensuração consiste na conversão do lactato a piruvato pela ação da lactato desidrogenase (LDh), ocorrendo consumo de NAD<sup>+</sup> com formação estequiométrica

de NADH, o qual pode ser monitorado espectrofotometricamente, fornecendo as concentrações de lactato existente na amostra. Segundo a reação:



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

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

[Lactato] = concentração de lactato produzida

Abs = Absorbância

6,22 = constante

V = volume da amostra

V1 = volume da amostra + tampão de ensaio

V2 = volume do soro com proteínas + TCA

V3 = volume do soro com proteínas

V4 = volume do soro desproteínizado + volume de neutralização

V5 = volume do soro desproteínizado

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

### 4.3.3 Mensuração do Triacilglicerol

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

### 4.4 PROLIFERAÇÃO CELULAR *EX VIVO*

Uma vez isoladas as células do tumor de Walker-256, estas foram cultivadas em meio de cultura RPMI-1640 enriquecido com 10% de soro fetal bovino e antibióticos (penicilina 10.000U e estreptomicina 10 mg/L) contendo inicialmente  $1 \times 10^5$  células por poço, em placas de 96 poços (volume 200  $\mu$ L), a 37°C em atmosfera de 95% ar/5% CO<sub>2</sub>. Concomitantemente ao plaqueamento das células tumorais, foi adicionado 20  $\mu$ L de uma solução contendo (2-14C)-timidina (0,02  $\mu$ Ci/poço). As células foram cultivadas por 48 horas. A timidina é análoga da base púrica timina e incorpora-se aos novos DNAs formados durante a proliferação. Após este período, as células foram coletadas automaticamente em coletor múltiplo (Skatron Combi Multiple Cell Harvester, UK) em papéis filtro nº 11731 (Skatron Combi – UK). Neste processo não há necessidade de processos extrativos preparatórios para obtenção de DNA celular. Os discos de papéis contendo a radioatividade incorporada no DNA foram transferidos para tubos contendo 1 mL de líquido de cintilação e levados para contagem da radioatividade em contador Beckman LS 6000.

### 4.5 PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

A peroxidação lipídica foi mensurada pelo método descrito por JIANG; WOOLLARD; WOLFF (1991). Este método quantifica a formação de hidroperóxido por miligrama de proteína durante a peroxidação lipídica. Baseia-se no princípio de que hidroperóxidos oxidam ferro a íon férrico e, por sua vez, este íon liga-se ao corante xilenol laranja.

Duzentos gramas de amostra de tumor de Walker 256 foram homogeneizados em 1mL de metanol e centrifugados a 5.000g por 5 minutos a 4°C. Para cada amostra, alíquotas de 90 µL do sobrenadante foram postas em 6 tubos de centrífuga (1,5 mL de capacidade). Três destes tubos foram adicionados 10 µL de solução metanólica de TPP (trifenilfosfina) a 10 mM, para haver a redução seletiva de hidroperóxidos. As amostras contidas nos três tubos restantes receberam apenas 10 µL de metanol. Todos os tubos foram agitados e então incubados em temperatura ambiente por 30 minutos. Terminada esta incubação, adicionou-se a cada tubo 900 µL do reagente FOX2 (xilenol laranja a 100 µM, hidroxitolueno butilado a 400 mM, ácido sulfúrico a 25 mM e sulfato ferroso de amônia em metanol 90%). Após agitação, o meio reacional foi incubado em temperatura ambiente por mais 30 minutos. A leitura foi realizada em espectrofotômetro na absorvância de 560 nm. Para a determinação da concentração de hidroperóxidos nas amostras, subtraiu-se o valor da absorvância das amostras tratadas com TPP do valor da absorvância das amostras sem TPP. O valor obtido foi, então, interpolado na curva padrão de peróxido de hidrogênio, a qual foi obtida com soluções padrão de peróxido de hidrogênio, de diferentes concentrações (100.0, 50.0, 25.0, 12.5, 6.2, 3.1 e 1.6 µM) submetidas aos mesmos procedimentos descritos acima para a dosagem de hidroperóxidos (com exceção ao tratamento com TPP). Dividiu-se o valor da concentração de hidroperóxidos (nmol/mL) pela concentração de proteínas (mg/mL), obtendo-se assim o valor de hidroperóxidos por quantidade de proteínas no sobrenadante do extrato (nmol de hidroperóxidos/mg de proteínas).

#### **4.5.1 Determinação da Quantificação Proteica para Peroxidação Lipídica**

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

A quantificação de proteína foi realizada pelo método de Bradford (1976), que utiliza o corante Coomassie Blue G 250 que se liga à proteína resultando em coloração azul, calculada com base em curva padrão de proteína conhecida. Foram

plaqueados 250  $\mu$ L de solução de Bradford e 10  $\mu$ L de cada um dos padrões ou das amostras (4 réplicas) em placas de 96 poços, sendo a leitura realizada no espectrofotômetro (TECAN® infinite M 200) a 595 nm.

#### **4.6 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA COM DODECIL SULFATO DE SÓDIO – (SDS-PAGE)**

O método "SDS-PAGE" descrito por Laemmli em 1960 foi desenvolvido para que esta migração dependa, principalmente, 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 migram para o pólo positivo do campo elétrico. Para isso é utilizado um gel de poliacrilamida de 4%, permitindo que todas as proteínas migrem com a mesma velocidade no início da corrida. Chegando ao gel de separação, as proteínas começam a migrar de acordo com seus tamanhos. A concentração de poliacrilamida do gel de separação deste estudo foi de 12%, adequado para separar a proteína Bcl-2 (26kDa). A polimerização desta mistura iniciou-se pela adição de persulfato de amônio (APS 10%) e TEMED. Posteriormente o gel foi submetido a uma voltagem constante de 200 V por aproximadamente 50 minutos utilizando o aparato de eletroforese (BIO-RAD® Mini PROTEAN). Esta separação é importante para posterior identificação das proteínas de interesse por "Western Blotting".

##### **4.6.1 WESTERN BLOTTING**

O método de "Western blotting", descrito por TOWBIN; STAEHELIN; GORDON (1979) baseia-se na identificação de proteínas específicas pelo uso de anticorpos mono ou policlonais. Após a separação das proteínas em SDS-PAGE, as proteínas foram eletrotransferidas (BIORAD® Semi-dry transfer cell) para uma membrana de nitrocelulose (BIO-RAD® TRANSBLOT) durante aproximadamente 1

hora sob uma voltagem constante de 25 V (5,5mA/cm<sup>2</sup>), contendo tampão de Transferência Bjerrum and Schafer-Nielsen (48 mM Tris, 39 mM glicina, 10% SDS e 20% metanol) previamente resfriado a 4°C. A membrana foi bloqueada por 1 hora à temperatura ambiente com tampão de bloqueio TBST (NaCl 4M, TrisHCl 1M, 0,05% Tween 20) contendo 5% de leite desnatado em pó (Molico-Nestlé) para evitar que anticorpos se liguem, inespecificamente, em regiões da membrana em que não há proteínas. Posteriormente, a membrana foi incubada com o anticorpo primário (*Santa Cruz® Biotechnology*), diluídos na proporção de 1:800 para Bcl-2, o qual se ligará à proteína que está sendo analisada em tampão de bloqueio 3% a 4°C por 14 horas sob agitação. As membranas, após lavagens com TBST, foram incubadas com anticorpo secundário conjugado diluído na proporção de 1:4000 em tampão de bloqueio 3% por 2 horas à temperatura ambiente. O uso de um conjugado; anticorpo secundário específico para o anticorpo primário ligado a uma enzima HRP (horseradish peroxidase) (*Pierce®*) foi realizado a fim de visualizar a interação antígeno-anticorpo. Pela adição de substrato quimioluminescente (*West Pico Sigma®*) (0,1mL/cm<sup>2</sup>) pode-se observar em filme Kodak® para radiografia, o sinal correspondente a proteína em questão. A densidade das bandas foi avaliada por densitometria (software Image J®), em relação à densidade da banda de um controle interno (actina).

#### **4.6.2 Determinação da Quantificação Proteica para Western Blotting**

Amostras de 100mg do tecido tumoral foram fragmentadas mecanicamente com o auxílio de um homogeneizador (BOSCH® GGS27 25000 rpm/min) em tampão de lise (Tris base 100mM, EDTA 10mM, SDS 1%, Fluoreto de Sódio 100mM, Pirofosfato de Sódio 10mM, Ortovanadato de Sódio 10mM) na proporção de 1:7, centrifugados durante 5 minutos a 17949 g (Eppendorf centrifuge® 5810 R) e o sobrenadante coletado para a quantificação protéica utilizando o método de Bradford (BRADFORD, 1976). A técnica baseia-se na ligação do corante Coomassie Blue G-250 à proteína resultando em coloração azul, a qual pode ser detectada em comprimento de onda de 595 nm. A concentração de proteínas das amostras foi calculada com base em curva padrão de proteína conhecida (Albumina Sérica Bovina). As amostras foram diluídas 10 vezes para não extrapolar a curva padrão e

plaqueadas com solução de Bradford em quadriplicata em placas de 96 poços, sendo a leitura realizada em espectrofotômetro (TECAN® infinite M 200).

O cálculo da concentração protéica de cada amostra foi feito a partir da equação da reta ( $y=ax+b$ ), sendo que  $y$ = absorbância e  $x$ = concentração de proteína. O valor de  $x$  encontrado foi multiplicado pela diluição da amostra para se obter a concentração de proteína da amostra em  $\mu\text{g/mL}$ . Após quantificação protéica das amostras, foi realizada diluição das mesmas utilizando tampão de Laemmli 5X (Tris HCl 0,5M, SDS 10%, bromofenol blue 0,5%, glicerol,  $\beta$ -mercaptoetanol 5%) de forma a deixar todas as amostras com a mesma concentração protéica de  $3 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ . O tampão Laemmli contém SDS (dodecil sulfato de sódio) para desnaturar a proteína e prover carga negativa constante de forma que todas fiquem com a mesma carga na amostra; glicerol para dar à amostra densidade maior do que o tampão de corrida e  $\beta$ -mercaptoetanol (agente redutor) para desfazer pontes dissulfeto da estrutura protéica, possibilitando a separação da amostra em subunidades.

#### **4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os dados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) dos grupos. A análise estatística utilizada foi a análise de variância de duas vias (ANOVA two-way). Para testar as diferenças entre os grupos, foi aplicado o pós teste de Bonferroni, com nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ). Foi utilizado o programa GraphPad Prism®.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DA CAQUEXIA

#### 5.1.1 Glicemia

Nos grupos portadores de tumor (SW, SWO, EXW, EXWO) o crescimento tumoral induziu a hipoglicemia (mg/dL). A glicemia dos grupos SW, SWO e EXW foram significativamente menores ( $p < 0,05$ ) que o seus respectivos grupos controles (S, SO e EX). O grupos EXW e EXWO apresentaram glicemia significativamente maiores ( $p < 0,05$ ) que os grupos SW e SWO, respectivamente. A Tabela 2 no Anexo 02, resume os dados da glicemia de todos os grupos.

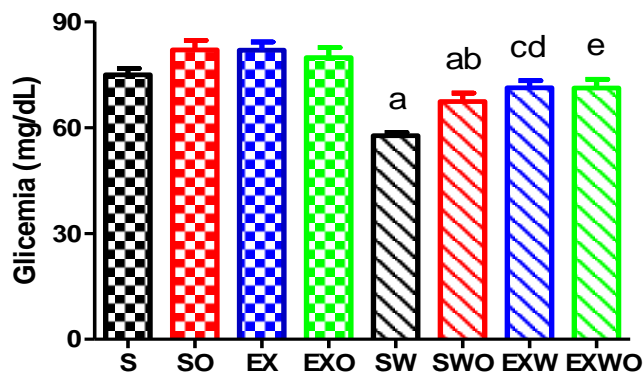


FIGURA 09. Glicemia (mg/dL) dos grupos Sedentário (S), Sedentário suplementado com óleo de peixe (SO), Exercitado (EX), Exercitado suplementado com óleo de peixe (EXO), Sedentário portador de tumor (SW), Sedentário portador de tumor suplementado com óleo de peixe (SWO), Exercitado portador de tumor (EXW), Exercitado portador de tumor suplementado com óleo de peixe (EXWO). Os dados estão apresentados como média  $\pm$  EPM de 10 animais/grupo.

<sup>a</sup>  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo S;

<sup>b</sup>  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo SO;

<sup>c</sup>  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo EX;

<sup>d</sup>  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo SW.

<sup>e</sup>  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo SWO.

### 5.1.2 Lactatemia

Todos os animais controle (S, SO, EX, EXO) mantiveram concentração de lactato semelhantes não sendo encontrada diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre estes. Portanto, observa-se que, a presença do tumor elevou significativamente a lactatemia (mmol/L) no grupo SW quando comparado ao seu grupo controle (S). A suplementação com óleo de peixe (SWO), o exercício (EXW) e a associação de ambos (EXWO) apresentaram concentrações menores em relação ao grupo SW. A Tabela 2 no Anexo 02, resume os dados da lactatemia de todos os grupos.

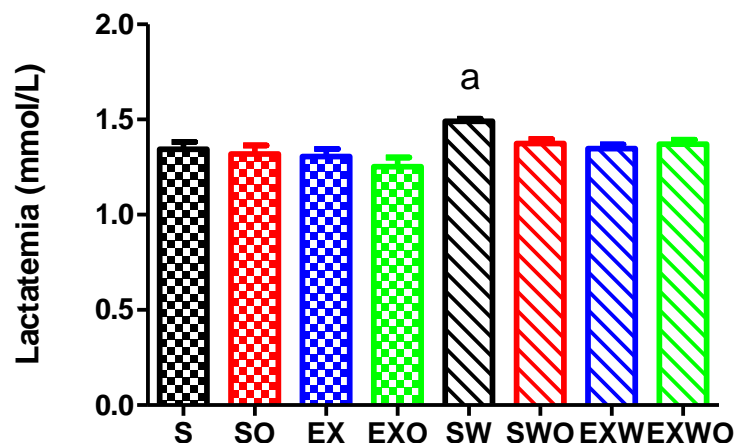


FIGURA 10. Lactato plasmático (mmol/L) dos grupos Sedentário (S), Sedentário suplementado com óleo de peixe (SO), Exercitado (EX), Exercitado suplementado com óleo de peixe (EXO), Sedentário portador de tumor (SW), Sedentário portador de tumor suplementado com óleo de peixe (SWO), Exercitado portador de tumor (EXW), Exercitado portador de tumor suplementado com óleo de peixe (EXWO). Os dados estão apresentados como média  $\pm$  EPM de 10 animais/grupo.

<sup>a</sup>  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo S;

### 5.1.3 Triacilglicerolemia

A concentração de triacilglicerol (TAG) dos animais do grupo S foi de  $42,73 \pm 7,21$  mg/dL. A suplementação com óleo de peixe (SO) não modificou a TAG ( $p < 0,05$ ). O mesmo foi observado quando do exercício (EX) e na condição com óleo de

peixe (EXO) ( $p < 0,05$ ). A presença do tumor elevou a TAG para  $183 \pm 21,19$  mg/dL (SW), a qual foi significativamente maior quando comparada ao grupo sedentário sem tumor ( $p < 0,05$  vs. S). Nos animais com tumor suplementados com óleo de peixe (SWO) a TAG foi de  $52,31 \pm 5,86$  mg/dL não sendo diferente do seu par sem tumor ( $p < 0,05$  vs. SO), mas foi diferente quando comparada à do grupo SW ( $p < 0,05$ ). O exercício físico nos animais com tumor (EXW) também reduziu a TAG ( $p < 0,05$  vs. SW), contudo ainda foi maior que a do seu par sem tumor ( $p < 0,05$  vs. EX). O mesmo foi observado quando da associação do exercício e óleo de peixe (EXWO) ao seu par ( $p < 0,05$  vs. EXO), mas EXW e EXWO foram significativamente menores quando comparados à TAG do grupo SW ( $p < 0,05$ ). A Tabela 2 no Anexo 02, resume os dados da triacilglicerolemia de todos os grupos.

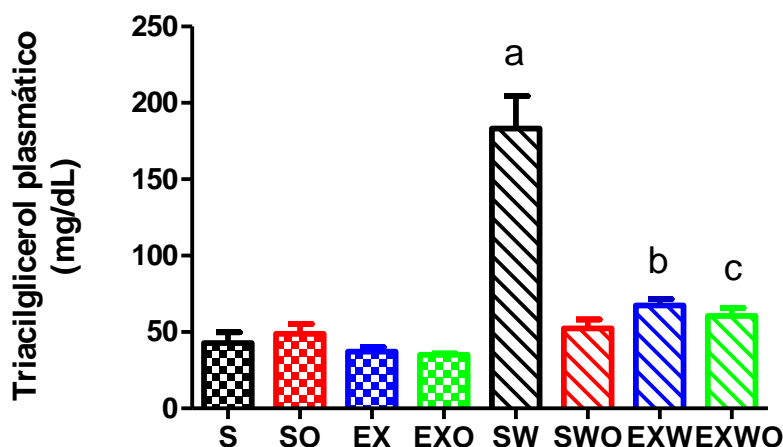


FIGURA 11. Triacilglicerol plasmático (mg/dL) dos grupos Sedentário (S), Sedentário suplementado com óleo de peixe (SO), Exercitado (EX), Exercitado suplementado com óleo de peixe (EXO), Sedentário portador de tumor (SW), Sedentário portador de tumor suplementado com óleo de peixe (SWO), Exercitado portador de tumor (EXW), Exercitado portador de tumor suplementado com óleo de peixe (EXWO). Os dados estão apresentados como média  $\pm$  EPM de 10 animais/grupo.

<sup>a</sup>  $p < 0,05$  vs. todos os grupos.

<sup>b</sup>  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo EX.

<sup>c</sup>  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo EXO;

## 5.2 PARÂMETROS RELATIVOS AO TUMOR DE WALKER 256

### 5.2.1 Peso dos tumores

O peso do tumor (Figura 12) no grupo sedentário portador de tumor (SW) foi de  $25,32\text{g} \pm 4,37$ . A suplementação com óleo de peixe (SWO) reduziu a massa tumoral para  $13,65 \pm 2,92$  ( $p < 0,05$  vs. SW). O exercício de salto (EXW) também teve efeito redutor da massa tumoral para  $12,78 \pm 2,25$  ( $p < 0,05$  vs. SW). A associação do exercício de salto e suplementação com óleo de peixe (EXWO) reduziu a massa tumoral para  $9,69 \pm 1,59$  ( $p < 0,05$  vs. SW), a qual não foi diferente quando comparada à dos grupos SWO, EXW e EXWO ( $p > 0,05$ ).

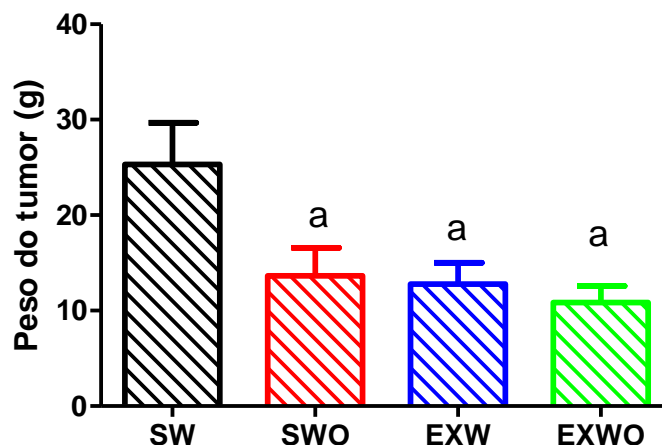


FIGURA 12. Peso dos tumores após 15 dias de inoculação nos grupos Sedentário portador de tumor (SW), Sedentário portador de tumor suplementado com óleo de peixe (SWO), Exercitado portador de tumor (EXW) e Exercitado portador de tumor suplementado com óleo de peixe (EXWO). Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 10 animais/grupo.

<sup>a</sup>  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo SW.

### 5.2.2 Peso corporal antes e após implantação do tumor

Na tabela 03 estão os dados referentes ao peso corporal dos animais antes e após implantação do tumor. Nos animais sem tumor, o grupo sedentário (S) após duas semanas ganhou em média 5 gramas. A suplementação com óleo peixe (SO) promoveu ganho médio de 13 g ( $p < 0,05$  vs. S). O exercício (EX) causou ganho de 11g ( $p < 0,05$  vs. S) e a associação de ambas as terapias (EXO), ganho de 13 g ( $p < 0,05$

vs. S). A presença do tumor levou a redução média de 7,5 g do peso corpóreo ( $p < 0,05$  vs. S). A suplementação com óleo de peixe (SWO) impediu a perda de peso (variação positiva de 8,0 g,  $p < 0,05$  vs SO), sendo superior a do grupo SW ( $p < 0,05$ ). O exercício de salto (EXW) impediu a perda de peso (variação positiva de 3 g,  $p < 0,05$  vs. SW), contudo o ganho de peso foi inferior quando comparado ao seu controle sem tumor ( $p < 0,05$  vs. EX). A associação de ambas as terapias (EXWO) não causou efeito adicional prevalecendo o efeito do exercício e não o da suplementação (variação positiva de 3 g,  $p < 0,05$  vs. EXO).

TABELA 3. Peso corpóreo antes e após implantação do tumor.

	PESO (g) NO DIA DA INOCULAÇÃO DO TUMOR	PESO (g) 15 DIAS APÓS INOCULAÇÃO DO TUMOR	GANHO DE PESO (g) BRUTO 15 DIAS APÓS INOCULAÇÃO	PESO (g) DO TUMOR	GANHO DE PESO (g) REAL 15 DIAS APÓS INOCULAÇÃO
<b>S</b>	396,3 ± 10,10	401,4 ± 9,50	5,1 ± 5,67	-	5,1 ± 5,67
<b>SO</b>	395,5 ± 9,52	408,5 ± 11,90	13,0 ± 6,95	-	13,0 ± 6,95 <sup>a</sup>
<b>EX</b>	369,0 ± 8,93	380,3 ± 11,90	11,3 ± 6,67	-	11,3 ± 6,67 <sup>a</sup>
<b>EXO</b>	389,7 ± 8,80	404,9 ± 7,91	13,7 ± 5,67	-	13,7 ± 5,67 <sup>a</sup>
<b>SW</b>	383,2 ± 17,11	400,7 ± 19,83	17,8 ± 7,92	25,32 ± 4,37	-7,52 ± 2,17 <sup>a</sup>
<b>SWO</b>	375,2 ± 13,67	396,3 ± 14,06	21,7 ± 7,49	13,65 ± 2,92	8,05 ± 3,19
<b>EXW</b>	366,8 ± 9,66	385,0 ± 11,75	16,4 ± 6,83	12,78 ± 2,25	3,62 ± 1,43 <sup>b</sup>
<b>EXWO</b>	368,2 ± 9,36	381,2 ± 11,44	13,0 ± 6,89	9,69 ± 1,59	3,31 ± 1,27 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> $p < 0,05$  vs. S;

<sup>b</sup> $p < 0,05$  vs. EX;

<sup>c</sup> $p < 0,05$  vs. EXO;

### 5.2.3 Proliferação de células tumorais “*ex vivo*”

Na Figura 13 estão apresentados os dados de proliferação de células tumorais cultivadas “*ex vivo*” durante 24 horas em contagem por minuto (cpm). A suplementação com óleo de peixe (SWO) causou redução significativa ( $p < 0,05$  vs. SW) da proliferação de células tumorais. O exercício físico (EXW) reduziu ainda

mais significativamente a proliferação de células tumorais quando comparada à dos grupos SW ( $p < 0,001$ ) e SWO ( $p < 0,05$ ). Ao associarmos óleo de peixe e exercício (EXWO) não observamos efeito aditivo sendo o resultado similar ao do provocado pelo exercício isoladamente ( $p < 0,001$  vs. SW e  $p < 0,05$  vs. EXW).

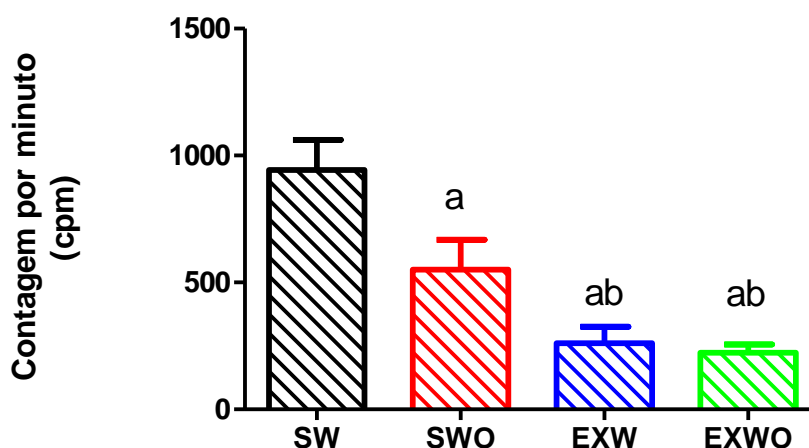


FIGURA 13: Proliferação de célula tumoral “*ex vivo*” em contagem por minuto (cpm) das células do tumor de Walker 256, após 24 horas de cultivo na presença de [(2-14C)-14C] – timidina em DNA, obtidas dos animais dos grupos Sedentário portador de tumor (SW), Sedentário portador de tumor suplementado com óleo de peixe (SWO), Exercitado portador de tumor (EXW), Exercitado portador de tumor suplementado com óleo de peixe (EXWO) (n=10 animais/grupo).

<sup>a</sup>  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo SW.

<sup>b</sup>  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo SWO.

#### 5.2.4 Peroxidação Lipídica

A suplementação com óleo de peixe (SWO) foi capaz de duplicar a lipoperoxidação da massa tumoral (70,96 nmol/mg proteína) quando comparada ao grupo sedentário portador de tumor que não foi suplementado (SW) ( $p < 0,05$ ). O exercício físico (EXW) também provocou este mesmo efeito na massa tumoral (82,40 nmol/mg proteína) quando comparada ao grupo SW ( $p < 0,05$ ). Quando associado o exercício físico e a suplementação com óleo de peixe (EXWO) não foi observado efeito adicional na produção de lipoperóxidos (85,63 nmol/mg proteína) quando comparado ao grupo sedentário portador de tumor (SW) ( $p < 0,05$ ).

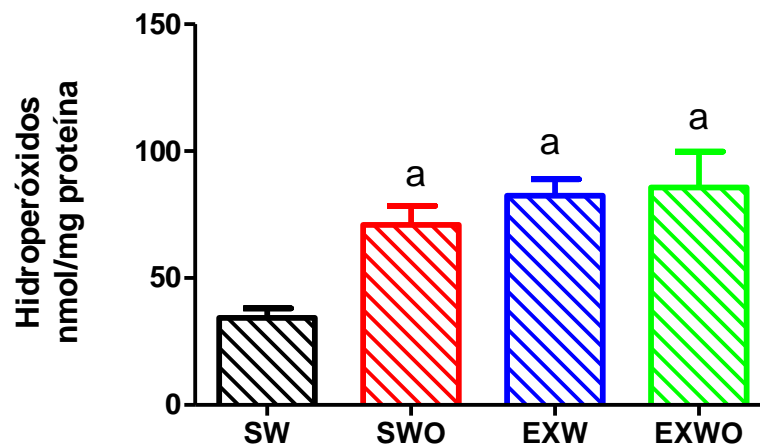


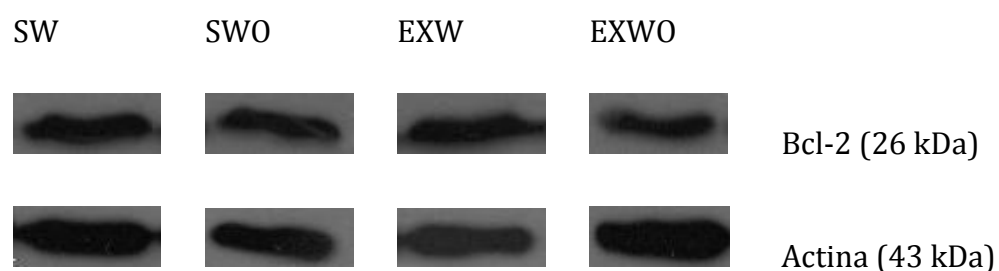
FIGURA 14. Lipoperoxidação (nmol/mg proteína no tumor) obtida dos animais dos grupos Sedentário portador de tumor (SW), Sedentário portador de tumor suplementado com óleo de peixe (SWO), Exercitado portador de tumor (EXW), Exercitado portador de tumor suplementado com óleo de peixe (EXWO). Os dados estão apresentados como média  $\pm$  EPM (n=10 animais/grupo).

<sup>a</sup>  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo SW.

## 5.2.5 “Western Blotting” de proteínas do tumor de Walker 256

### 5.2.5.1 Expressão de Bcl-2

Na figura 15 estão os dados referentes a expressão de Bcl-2. A suplementação com óleo de peixe (SWO) reduziu significativamente a expressão de Bcl-2 em 13% quando comparada à do grupo SW ( $p < 0,05$ ). O exercício (EXW) induziu ainda mais esta diminuição em 16% quando comparada ao grupo SW ( $p < 0,05$ ). A suplementação associada ao exercício físico (EXWO) não teve efeito adicional em relação à diminuição da expressão da Bcl-2 quando comparada aos grupos SWO e EXW, mas diminuiu significativamente em 15% quando comparada ao grupo SW ( $p < 0,05$ ).



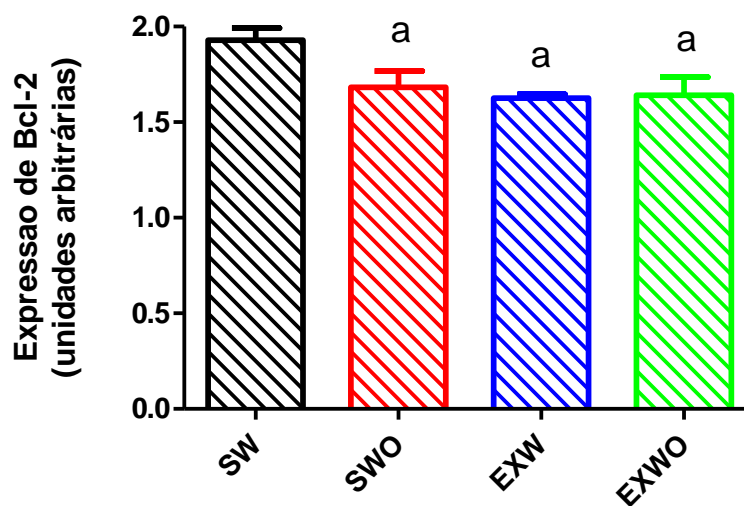


FIGURA 15. Expressão de Bcl-2 no tecido tumoral (unidades arbitrárias) dos animais dos grupos Sedentário portador de tumor (SW), Sedentário portador de tumor suplementado com óleo de peixe (SWO), Exercitado portador de tumor (EXW), Exercitado portador de tumor suplementado com óleo de peixe (EXWO). Os dados estão apresentados como média  $\pm$  EPM (n=10 animais/grupo).

<sup>a</sup>  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo SW.

## 6 DISCUSSÃO

O câncer tem se consolidado como problema de saúde pública em todo o mundo. Segundo a ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS), o câncer atinge pelo menos nove milhões de pessoas e mata cerca de cinco milhões a cada ano, sendo hoje a segunda causa de morte por doenças nos países desenvolvidos (SILVA, 2006). Dentre os diferentes casos de câncer, 30% estão ligados ao consumo excessivo de AGPI n-6 e a baixa ingestão de AGPI n-3 (McENTEE; WHELAN, 2002).

A dieta com AGPI n-3 na forma de óleo de peixe vem sendo demonstrada ser capaz de reduzir o crescimento tumoral em modelos animais (SCHIESSEL, 2011; MINUZZI, 2006; TAPIERO *et al.*, 2002; BOUDREAU *et al.*, 2001; ROBINSON *et al.*, 2001; PETRIK *et al.*, 2000). Estudos em humanos e em animais tem demonstrado, desde 1980, que o exercício também tem alguns efeitos protetores contra malignidades (ZIELINSKI *et al.*, 2004; LEUNG *et al.*, 2004; WESTERLIND, 2003; HOFFMANGOETZ; HUSTED, 1995) e efeitos benéficos quando praticados por indivíduos com câncer (NUNES *et al.*, 2007). Dentre estes estudos, destacam-se aqueles que identificaram inibição da tumorigênese (BARACOS, 1989), resistência a implantação do tumor, diminuição da taxa de crescimento tumoral, redução de metástases (LEE, 1995) e aumento da síntese protéica muscular (AL-MAJID; McCARTHY, 2001b). Sessão de treinamento de força desencadeia perturbação fisiológica que eleva as taxas de síntese protéica no tecido muscular esquelético 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 este tipo de exercício físico em indivíduos que apresentam alto índice de perda de tecido muscular.

Nesta abordagem experimental, ratos adultos foram suplementados com 1 g/kg de peso corporal/dia de óleo de peixe e submetidos a protocolo de treinamento de saltos durante 8 semanas. Após a implantação do tumor de Walker 256, verificou-se que a suplementação com óleo de peixe rico em AGPI n-3 e o treinamento de saltos promoveram menor crescimento, significativo, do tumor quando comparado ao grupo sedentário (SW) (FIGURA 12). A suplementação associada ao treinamento de saltos não apresentou efeito aditivo quanto à este parâmetro.

Em estudos de FOLADOR *et al.* (2006), MUND *et al.* (2007), AIKAWA *et al.*, (2008) e BELO *et al.*, (2010) foram demonstrados que a suplementação com o óleo de peixe levou a menor massa tumoral em aproximadamente 50% dos ratos com tumor de Walker 256. LEUNG *et al.* (2004), demonstraram resultados similares quando utilizaram exercício físico, encontrando diminuição de 27% do crescimento do tumor em pacientes com câncer de próstata. O exercício físico pode influenciar o crescimento tumoral, resultando em regressão e atraso no seu crescimento (ZIELINSK *et al.*, 2004, NUNES, 2005). LIMA (2007) relata em outro estudo com ratos portadores de tumor que, após treinamento de dez séries de saltos os animais apresentaram cerca de 34% de redução do crescimento tumoral e atenuação de alguns sintomas da caquexia. Em investigação de MINUZZI (2006), também foi constatado o efeito do treinamento de saltos (8 semanas) sobre a menor taxa de crescimento tumoral em ratos portadores do tumor de Walker 256. Neste mesmo modelo experimental animal, utilizando exercícios de natação e de saltos, os ratos apresentaram redução em 25% do crescimento tumoral, quando comparado aos ratos sedentários e sem suplementação (KRYCZYK, 2008).

Além da diminuição do crescimento tumoral observado neste presente estudo, o exercício físico e a suplementação com óleo de peixe também foram capazes de atenuar algumas mudanças metabólicas decorrentes da instalação da síndrome da caquexia.

A caquexia, considerada uma das manifestações mais comuns em doenças malignas avançadas, ocorre na maioria dos pacientes com câncer sendo responsável por 22% das mortes (ARGILÉS; BUSQUETS; LOPES-SORIANO, 2005). O estabelecimento desta é detectado pela presença de hipoglicemia, hiperlactatemia, hipertriacilglicerolemia, além de redução do conteúdo de glicogênio e perda de peso (PINTO *et al.*, 2004). Esta mudança no perfil plasmático de carboidratos, lipídeos e metabólitos, está presente em portadores de tumor (TISDALE, 2009). Sintomas como hipoglicemia, hiperlactatemia, hipertriacilglicerolemia e perda de peso foram encontrados neste estudo nos ratos com tumor que não foram submetidos a treinamento e/ou suplementação (FIGURAS 9, 10 e 11), enquanto que os ratos que realizaram o protocolo de treinamento ou que foram submetidos à suplementação com óleo de peixe não tiveram estes parâmetros presentes, significando impedimento de instalação do quadro de caquexia.

Estes resultados corroboram com outros estudos nos quais animais portadores de tumor suplementados com óleo de peixe apresentaram efetiva redução de parâmetros da caquexia como menor peso do tumor, menor depleção da massa corpórea, maior glicemia, menor lactatemia, menor triacilglicerolemia, maior produção e menor resistência à insulina, e maior reserva de glicogênio hepático e muscular (PINTO *et al.*, 2004; PIZATO *et al.*, 2005; FOLADOR *et al.*, 2006; IAGHER, 2008; BORGHETTI, 2010).

A manutenção da glicemia nos grupos EXW e EXWO pode ser explicada pelo fato do exercício de força, especificamente, ter a propriedade de aumentar a captação e o transporte de glicose na musculatura esquelética (YASPELKIS *et al.*, 2002). Como observado na FIGURA 9, estes respectivos grupos apresentaram glicemia comparável à dos animais do grupo controle, dados que corroboram com as afirmações de YASPELKIS *et al.*, (2002) sobre a influência do treinamento sobre o metabolismo de carboidratos.

A menor concentração glicêmica observada no grupo SW em relação à dos demais grupos, é explicada pelo fato do tumor de Walker 256 ser o maior consumidor de glicose e produtor de lactato (hiperlaticidemia). O lactato é convertido em glicose no fígado do hospedeiro na tentativa de manutenção da concentração sérica deste substrato. Este mecanismo conhecido como Ciclo de Cori (FIGURA 3), encontra-se aumentado e pode representar considerável prejuízo energético para o portador de tumor, pois a gliconeogênese é um processo metabólico muito ineficiente (gasto de 06 moléculas de ATP para cada ciclo), porém este processo é essencial para compensar a acidose tumoral (ARGILÉS; BUSQUETS; LOPES-SORIANO, 2005). Este consumo alto de glicose via anaeróbia é observado na maioria dos tumores de crescimento rápido (ARGILÉS; ALVAREZ; LOPES-SORIANO, 1997). Este mecanismo compensatório (gliconeogênese) é necessário para manutenção plasmática dos substratos do hospedeiro que são parcialmente captados pelo tecido tumoral (PINTO *et al.*, 2004; ARGILÉS; ALVAREZ; LOPES-SORIANO, 1997). Estas alterações tornam-se mais pronunciadas com a progressão da doença (Shaw e Wolfe, 1997) e contribuem para a depleção nutricional do paciente, uma vez que são processos de alto gasto energético. O custo energético do “turnover” aumentado da glicose nos pacientes com câncer ultrapassa 260 kcal/dia (EDÉN; EDSTRÖM; BENNEGARD, 1984).

Outra alteração metabólica decorrente do intenso quadro catabólico e aumento da demanda energética que se instala no indivíduo portador de tumor é o aumento da quebra de gordura que resulta em liberação de glicerol e ácidos graxos. Mudanças que ocorrem basicamente devido à inibição da lipase lipoprotéica (LPL) e aumento na atividade da lipase hormônio sensível (HSL). Ainda verifica-se 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 (acetil-Coa carboxilase e AG sintase) (ARGILÉS; BUSQUETS; LOPES-SORIANO, 2005). A diminuição da atividade da LPL acarreta em hipertriacilglicerolemia e compromete a absorção de lipídeos pelo tecido adiposo e muscular (NOGUCHI et al., 1996). De fato, neste estudo os ratos do grupo SW que não tiveram nenhum tipo de intervenção (suplementação ou exercício físico) apresentaram concentração de triacilglicerol significativamente maior que os demais grupos (SWO, EXW, EXWO) e também apresentaram maior crescimento tumoral.

Outro componente importante relacionado à instalação da caquexia é a progressiva perda de peso. A maior perda de peso observada, neste estudo, foi no grupo sedentário portador de tumor (SW) quando comparada aos demais grupos (S, SO, EX, EXO, SWO, EXW e EXWO) (TABELA 3). A perda de peso involuntária é geralmente um dos sinais mais precoces de pacientes com câncer. Assim sendo, os aspectos nutricionais desses pacientes devem ser sempre avaliados à luz de qualquer possibilidade terapêutica, ainda que essa seja paliativa. Estes pacientes costumam apresentar em geral, anorexia, vômitos e algum grau de obstrução do trato digestivo, principalmente em tumores localizados nas vias digestivas altas. Como consequência, ocorre emagrecimento involuntário, o que em fase avançada caracteriza-se como estado de caquexia (STRASSER; BRUERA, 2002).

Suplementos nutricionais que contêm AGPI n-3 são benéficos para reduzir a perda de peso associada a caquexia/câncer para pacientes com neoplasias em estado avançado. Ensaios clínicos sugerem que AGPIs n-3 podem estabilizar a perda de peso ou levar ao ganho de peso em pacientes com câncer avançado com caquexia (MANTOVANI *et al.*, 2006; WIGMORE *et al.*, 2000; BURNS *et al.*, 1999). Esta perda de peso corporal em indivíduos caquéticos está associada à presença de fator indutor de proteólise (PIF) secretado pelo tumor (TISDALE, 2000). Estudo de suplementação com EPA, verificou uma atenuação da degradação protéica e da indução do sistema proteolítico ubiquitina-proteosoma pelo PIF, pela interferência

com eventos de sinalização intracelular, prevenindo o acúmulo nuclear do NF- $\kappa$ B (WHITEHOUSE; TISDALE, 2003), que quando ativado, bloqueia a morte celular programada (apoptose) (SCHWARTZ; HERNANDEZ; EVERS, 1999). Desta forma, menor ativação do NF- $\kappa$ B modulado por AGPIs n-3 contribui para a restauração da apoptose (MUND *et al.*, 2007).

MINUZZI (2006) relata em seu estudo que a manutenção do peso corporal encontrado tanto nos animais suplementados como nos animais exercitados corrobora um crescente corpo de evidências indicando os benefícios potenciais do exercício físico para melhoria da qualidade de vida de pacientes com câncer (SMITH *et al.*, 1996; COURNEYA; FRIEDENREICH, 1999; PINTO; MARUYAMA 1999; COURNEYA; KEATS; TURNER, 2000; COURNEYA; BLANCHARD; LAING, 2001; COURNEYA *et al.*, 2004). O potencial da aplicação do exercício em várias condições parece estar correlacionado com o fato da promoção de adaptações em todos os sistemas do organismo (COSTA ROSA, 2004), e para certos tipos de câncer o efeito profilático do exercício já está bem estabelecido (ZIELINSKI *et al.*, 2004).

Vários mecanismos tem sido propostos para explicar as ações dos AGPIs n-3 na carcinogênese. Dentre estes, está a habilidade de AGPIs n-3 em induzir apoptose nas células tumorais, a qual tem sido atribuída à suscetibilidade aumentada destas células à peroxidação lipídica (SPITELLER, 2003; STOLL, 2002). A suplementação com óleo de peixe (SWO) neste presente estudo, foi capaz de induzir a produção de maiores quantidades de hidroperóxidos quando comparada à do grupo sedentário portador de tumor (SW). Este resultado corrobora com o estudo de MUND *et al.* (2007) no qual tumores obtidos de ratos portadores do tumor de Walker-256 suplementados com óleo de peixe, rico em AGPIs n-3, apresentaram maior peroxidação lipídica do que ratos não suplementados. A relação do câncer com a taxa de peroxidação lipídica é explicada pelo fato de que as membranas das células e organelas contém grandes quantidades de ácidos graxos poliinsaturados e a fluidez da membrana relaciona-se à presença destas cadeias insaturadas de fosfolipídios e do colesterol. Desta forma, danos desta camada lipídica tendem a diminuir a fluidez da membrana. Embora todos os componentes celulares são suscetíveis à ação de espécies reativas de oxigênio, a membrana é um dos mais atingidos em decorrência da peroxidação lipídica, a qual acarreta alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas celulares, conseqüentemente, há perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, e formação de produtos citotóxicos (como o

malonaldeído), culminando com a morte celular (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). A peroxidação lipídica pode ser definida como uma cascata de eventos bioquímicos (FIGURA 16) resultante da ação dos radicais livres sobre os lípideos insaturados das membranas celulares (CURI *et al.*, 2002), levando à destruição de sua estrutura, falência dos mecanismos de troca de metabólitos e, numa condição extrema, à morte celular (BENZIE, 1996). Na maioria das vezes esta relação se dá pela propriedade que os radicais livres têm de reagir com os AGPI, servindo como iniciadores do processo de peroxidação lipídica ou lipoperoxidação (LPO). Uma vez que o AGPI n-3 do óleo de peixe incorpora-se na membrana das células tumorais e é oxidado, aumenta a peroxidação, sendo reconhecido que os peróxidos lipídicos inibem o crescimento de células tumorais.

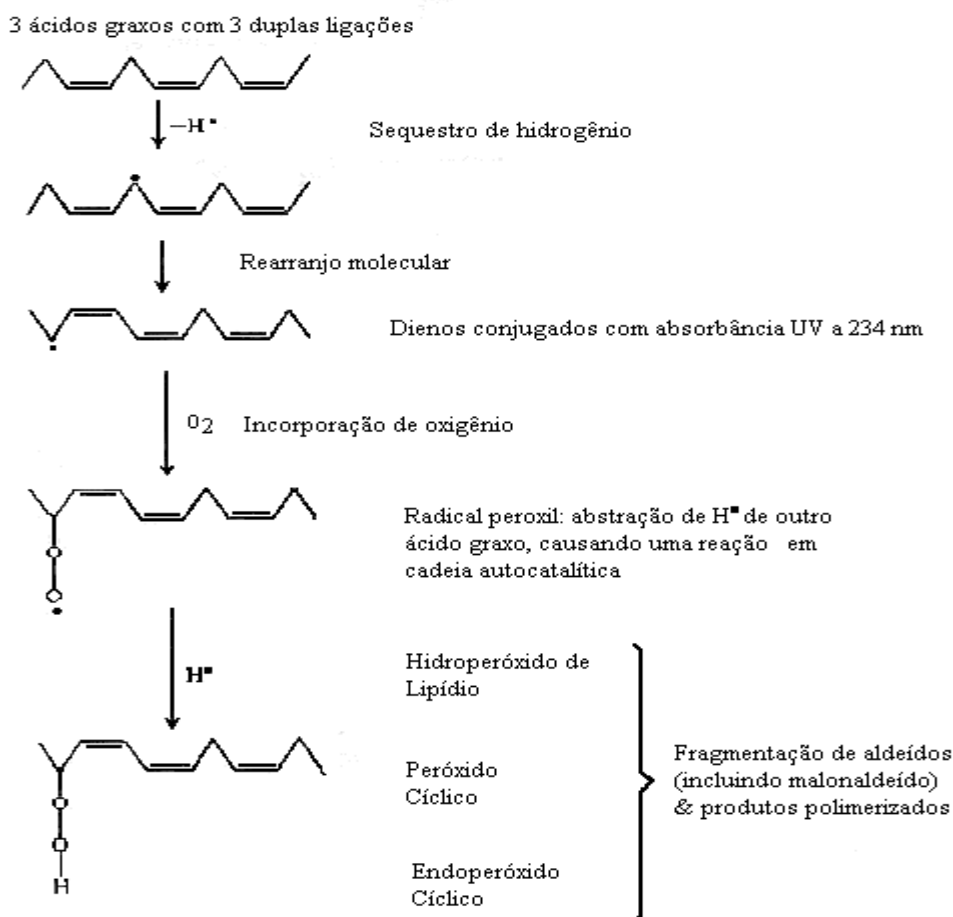


FIGURA 16. Peroxidação lipídica: uma reação em cadeia. Adaptada de HALLIWELL; GUTTERIDGE (1991).

Estresse oxidativo ocorre, devido à deficiência no sistema antioxidante, frente à maior produção de Espécies Reativas do Oxigênio (EROS) e Espécie Reativa do Nitrogênio (ERN) pelas células tumorais. Os radicais livres gerados danificam diretamente as moléculas de DNA e os lipídios de membrana, induzindo a geração de novos radicais criando outras espécies quimicamente bastante reativas, como o peróxido de hidrogênio, ânion superóxido, aldeídos, etc. Essa oxidação de biomoléculas é um dos fatores determinantes das consequências do estresse oxidativo. Dentre as espécies reativas capazes de promover este tipo de reação, o radical hidroxil (OH•) está entre as que possuem maior capacidade oxidante. Este radical é capaz de abstrair praticamente qualquer hidrogênio ligado a carbono, reagindo com várias moléculas biológicas. A formação de um radical lipídico é o fator chave para o início da peroxidação lipídica, assim o radical lipídico pode ser formado a partir do peróxido de hidrogênio, do ânion superóxido (MUEHLMANN, 2008). Esta relação entre a peroxidação lipídica e os AGPI está na indução da citotoxicidade, induzindo a apoptose das células. Isto pode ocorrer porque sabe-se que os produtos de peroxidação podem alterar a estrutura da membrana celular levando à morte celular (PIZATO *et al.*, 2005).

O exercício físico (EXW) associado a suplementação de óleo de peixe (EXWO) levaram a produção de maiores quantidades de hidroperóxidos quando comparada à do grupo sedentário portador de tumor (SW). Estudos tem mostrado que o exercício físico é capaz de induzir a peroxidação lipídica (GAGO-DOMINGUEZ *et al.*, 2005), aumentar a peroxidação lipídica e a produção de radicais livres após a atividade física, em modelos animais e humanos (CLARKSON; THOMPSON, 2000; JILL, 1996). Em estudo de KRYCZYK (2008), o exercício físico (EXW) foi capaz de induzir a produção de mais hidroperóxidos quando comparada à do grupo sedentário portador de tumor.

No metabolismo oxidativo, grande parte do oxigênio consumido é ligado ao hidrogênio durante o processo de fosforilação oxidativa, gerando água. No entanto, aproximadamente 4-5% do oxigênio, consumido durante a respiração não é completamente reduzido à água, formando radicais livres. Durante o exercício físico o consumo de oxigênio aumenta e em paralelo aumenta também a produção de radicais livres e a peroxidação lipídica (CLARKSON; THOMPSON, 2000). A produção de radicais livres e peroxidação lipídica causada pelo exercício físico pode ser importante mecanismo contra o câncer (GAGO-DOMINGUEZ *et al.*, 2005).

Outro resultado importante nesta investigação refere-se a redução significativa da proliferação de células tumorais no grupo exercitado (EXW) e exercitado suplementado com óleo de peixe (EXWO). 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; JIANG; WANG, 2000; KRYCZYK, 2008). Isto talvez possa ser explicado pelo fato de o exercício físico contribuir para diminuição das concentrações séricas de IGF-1 (fator de crescimento parecido com a insulina) e aumentar os 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. Esta mudança nas concentrações séricas desta proteína pode aumentar o conteúdo da proteína p53 no tumor que 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 causam a parada do ciclo celular ou que façam a célula entrar em apoptose a partir da transcrição de genes de proteínas pró-apoptóticas. O aumento na concentração de p53 no tecido tumoral leva à aumento na relação Bax/Bcl-2 (JIANG; WANG, 2000) o que propicia a entrada da célula no processo de morte programada culminando com a ativação da cascata de caspases. Este poderia ser um possível mecanismo pelo qual os grupos exercitados mostraram menor capacidade proliferativa de células tumorais.

Outro possível mecanismo para explicar a menor proliferação celular nos grupos suplementados com óleo de peixe pode ser o aumento da apoptose em células tumorais decorrente da maior produção de lipoperoxidação, onde a suplementação com óleo de peixe promoveu aumento da peroxidação lipídica no tecido tumoral. Isto pode explicar um dos efeitos dos ácidos graxos poliinsaturados (EPA e DHA) na inibição do crescimento do tumor (MUND *et al.*, 2007; IAGHER, 2008), uma vez que estes ácidos graxos são mais suscetíveis à peroxidação lipídica, particularmente, por possuírem duas ou mais insaturações.

Resistência à apoptose é uma das principais características adquiridas pelas células tumorais (PERKINS, 2004). Um dos fatores determinantes para a célula entrar ou não neste processo de morte programada é a relação entre as concentrações das proteínas pró (Bax) e anti-apoptóticas (Bcl2). Sendo assim, células que têm superexpressão de Bcl-2 poderiam escapar da apoptose pelo fato de estarem inibindo a ativação de proteínas pró-apoptóticas. A proteína Bcl-2 encontra-se ligada a membrana mitocondrial externa pela porção C-terminal, evitando o aumento da permeabilidade

da membrana mitocondrial. Ela o faz, provavelmente, por ligar-se e inibir outras proteínas pró-apoptóticas também da família Bcl-2, por exemplo, a Bax. O aumento da permeabilidade das membranas mitocondriais pode ocasionar o efluxo de proteínas mitocondriais e promover o início de cascata sinalizadora para a morte celular programada (KROEMER *et al.*, 2007). Tanto o ganho de função de Bcl-2 como a perda de função de Bax estão associados com o aumento da sobrevivência do câncer e resistência a apoptose (SCHORR *et al.*, 1999).

Bcl-2 estão entre os primeiros genes identificados no envolvimento da regulação da apoptose (COTTER, 2009), interagindo com uma variedade de fatores pró-apoptóticos para regular a via intrínseca da apoptose. Bcl-2 funcionalmente age como proto-oncogene promovendo a tumorigênese, impedindo a morte celular (HANAHAN; WEINBERG, 2000).

Neste estudo observou-se que tanto o exercício físico (EXW) bem como a associação deste com a suplementação com óleo de peixe (EXWO) foram capazes de diminuir a expressão de Bcl-2 quando comparada à do grupo SW (FIGURA 15), favorecendo o balanço pró-apoptótico no ambiente tumoral. Suplementação com óleo de peixe tem sido demonstrado em aumentar a apoptose em modelos animais com carcinogênese coloretal (MANNA *et al.*, 2008). A suplementação com óleo de peixe (SWO) também foi hábil em diminuir Bcl-2, isto sugere que, a *down-regulation* de Bcl-2 pode ser um dos mecanismos pelos quais o óleo de peixe pode sensibilizar a apoptose em células cancerosas (MANNA *et al.*, 2008). A expressão aumentada de Bcl-2 e de seus homólogos anti-apoptóticos, não apenas promove proteção contra apoptose como também aumenta o tempo de vida da célula (KIM *et al.*, 2006). 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).

Estes resultados corroboram com estudos anteriores de que o exercício físico e a suplementação com óleo de peixe possuem funções importantes no auxílio do tratamento de pessoas com tumor.

## 7 CONCLUSÃO

O treinamento de força e a suplementação com óleo de peixe foram eficazes em reduzir o peso tumoral, proliferação das células tumorais e expressão de BCL-2, além de atenuar a instalação da caquexia em ratos portadores de tumor de Walker 256.

O treinamento de força e a suplementação com óleo de peixe em ratos portadores de tumor de Walker 256 aumentaram a peroxidação lipídica, podendo favorecer balanço pró-apoptótico.

A associação da suplementação de óleo de peixe ao treinamento de força não causou efeito aditivo em relação ao já promovido por ambos isoladamente, o que pode indicar uma via comum de ação.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIKAWA, J. *et al.* Glucose metabolism by lymphocytes, macrophages, and tumor cells from Walker 256 tumor-bearing rats supplemented with fish oil for one generation. **Cell. Biochem. Funct.** 26 (8): 874-80, 2008.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. **Biologia molecular da célula**. 5ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

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

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

AL-MAJID, S. & McCARTHY, D. O. Resistance Training attenuates wasting of the extensor digitorum longus muscle in mice bearing the Colon-26 Adenocarcinoma. **Biolog Res Nurs.** 3:155-166, 2001b.

AMARANTE-MENDES, G.P., MCGAHON, A.J., NISHIOKA, W.K., AFAR, D.E., WITTE, O.N., GREEN, D.R. Bcl-2 independent Bcr-abl-mediated resistance of apoptosis: protection is correlated with upregulation of Bcl-xL. **Oncogene.** 16: 1383-90, 1998.

AMERICAN COLLEGE OF SPORTS MEDICINE (ACSM). Position stand. Progression models in resistance training for healthy adults. **Med Sci Sports Exerc.** 34: 364–380, 2002.

ANAND, P., KUNNUMAKARA, A.B., SUNDARAM, C., HARIKUMAR, K.B., THARAKAN, S.T., LAI, O.S., SUNG, B., AGGARWAL, B.B. Cancer is a Preventable Disease that Requires Major Lifestyle Changes. **Pharmaceutical Research.** 25 (9): 2097-2116, 2008.

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

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

ARGILÉS, J.M.; MOORE-CARRASCO, R.; BUSQUETS, S.; LÓPEZ-SORIANO, F.J. Catabolic mediators as targets for cancer cachexia. **DDT.** 8(18): 838–844, 2003.

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.

BARACOS, E.V. Regulation of skeletal-muscle-protein turnover in cancer associated cachexia. **Nutrition.** 16 (10): 1015-1018, 2000.

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

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

BELO, S. R. B. et al. Walker-256 tumor growth is inhibited by the independent or associative chronic ingestion of shark liver and fish oil: a response linked by the increment of peritoneal macrophages nitrite production in Wistar rats. **Nutrition Research** 30: 770–776, 2010.

BERQUIN, I.M., EDWARDS, I.J., CHEN, Y.Q. Multi targeted therapy of cancer by omega-3 fatty acids. **Cancer Lett** 269 (2): 363-377, 2008.

BERQUIN, I.M., MIN, Y., WU, R., WU, J., PERRY, D., CLINE, J.M., THOMAS, M.J., THORNBURG, T., KULIK, G., SMITH, A. Modulation of prostate cancer genetic risk by omega-3 and omega-6 fatty acids. **J Clin Invest** 117:1866–1875, 2007.

BONATTO, S. J. R. *et al.* Lifelong exposure to dietary fish oil alters macrophage responses in Walker 256 tumor-bearing rats. **Cellular Immunology** 23: 56–62, 2004.

BORGHETTI, G. Efeito da suplementação com óleo de peixe sobre a expressão gênica de cox-2 em ratos portadores de tumor de walker 256. **Dissertação de Mestrado**. UFPR, 2010.

BOSSOLA M., MUSCARITOLI M., COSTELLI P., GRIECO G., BONELLI G., PACELLI F., ROSSIFANELLI F., DOGLIETTO G.B., BACCINO F.M. Increased muscle proteasome activity correlates with disease severity in gastric cancer patients. **Ann Surg** 237:384-389, 2003.

BOOTH, F. W., CHAKRAVARTHY, M. V., GORDON, S. E., SPANGENBURG, E. E. Waging war on physical inactivity: using modern molecular ammunition against an ancient nemy. **J Appl Physiol** 93: 3-30, 2002.

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

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.

BRASIL. Ministério do Desenvolvimento Social. **Estimativas 2010**: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Câncer, 2009. p. 98.

BRAYAND, F., MOLLER, B. Predicting the future burden of cancer. **Nat Rev Cancer** 6: 63–74, 2006.

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

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

BURNS, C.P., HALABI, S., CLAMON, G.H., HARS, V., WAGNER, B.A., HOHL, R.J., LESTER, E., KIRSHNER, J.J., VINCIGUERRA, V., PASKETT, E. Phase I clinical study of fish oil fatty acid capsules for patients with cancer cachexia: cancer and leukemia group B study 9473. **Clin Cancer Res** 5: 3942–3947, 1999.

CABAL-MANZANO, R., BHARGAVA, P., TORRES-DUARTE, A., MARSHALL, J., BHARGAVA, P., WAINER, I.W. Proteolysis-inducing factor is expressed in tumours of patients with gastrointestinal cancers and correlates with weight loss. **Br J Cancer** 84: 1599-1601, 2001.

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

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

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

COLDITZ, G. A., CANNUSCIO, C. C., FRAZIER, A. L. Physical activity and reduced risk of colon cancer: implications for prevention. **Cancer Causes Control.** 8: 649–67, 1997.

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

COTTER, T.G. Apoptosis and cancer: the genesis of a research field. **Nat Rev Cancer** 9: 501-7, 2009.

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

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

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

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

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

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

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

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

EDÉN, E., EDSTRÖM, S., BENNEGARD, K. et al. Glucose flux in relation to energy expenditure in malnourished patients with and without cancer during periods of fasting and feeding. **Cancer Res** 44:1718-24, 1984.

ELEY, H.L., TISDALE, M.J. Skeletal muscle atrophy, a link between depression of protein synthesis and increase in degradation. **J Biol Chem** 282: 7087-7097, 2007.

ELIZABETH, T.H., FONTHAM, D.R.P.H., MICHAEL, J.T., ELIZABETH, W., ALAN, J. B., JOHN, O.L.D., JONATHAN, M.S. American Cancer Society Perspectives on Environmental Factors and Cancer. **CA Cancer J Clin** 59:343-351, 2009..

ENGLE-JONES, J. B. Causes and elimination of erratic blanks in enzymatic metabolite assays involving the use of NAD in alkaline Hydrazine buffers, improved conditions of L-glutamate, L-Lactate, and other metabolites. **Annals of Biochemistry** 88:475-484, 1978.

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

FEARON, K.C., HANSELL, D.T., PRESTON, T., et al. Influence of whole body protein turnover rate on resting energy expenditure in patients with cancer. **Cancer Res** 48: 2590–2595, 1988.

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

FERREIRA, A.L.A; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev Ass Med Brasil** 43 (1): 61-8, 1997.

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

FOX, K.M., BROOKS, J.M., GANDRA, S.R., MARKUS, R., CHIOU, C.F. Estimation of cachexia among cancer patients based on four definitions. **Journal of Oncology**. 2009.

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

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

FUJIKI, F., MUKAIDA, N., HIROSE, K., ISHIDA, H., HARADA, A., OHNO, S., BLUETHMANN, H., KAWAKAMI, M., AKIYAMA, M., SONE, S., MATSUSHIMA, K. Prevention of adenocarcinoma colon 26-induced cachexia by interleukin 10 gene transfer. **Cancer Res** 57: 94-99, 1997.

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

GASPAROTTO, E.P.L. Expressão de genes e proteínas anti e pró-apoptóticas em células precursoras da medula óssea e leucócitos do sangue periférico de pacientes portadores de policitemia vera. **Tese de doutorado**. Universidade de São Paulo. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. 2009.

GIACOSA, A., RONDANELLI, M. Fish oil and treatment of cancer cachexia. **Genes Nutr** 3:25-28, 2008.

GLASS, J.D. Molecular mechanism modulating muscle mass. **TRENDS in Molecular Medicine**. 9 (8): 344-350, 2003.

GOMES-MARCONDES, M.C., SMITH, H.J., COOPER, J.C., TISDALE, M.J. Development of an in-vitro model system to investigate the mechanism of muscle protein catabolism induced by proteolysis inducing factor. **Br J Cancer** 86: 1628-33, 2002.

HALL, M.N., CHAVARRO, J.E., LEE, I., WILLETT, W.C., MA, J. A 22-year prospective study of fish, n-3 fatty acid intake, and colorectal cancer risk in men. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 17(5): 1136-1143, 2008.

HANAHAN, D., WEINBERG, R.A. The hallmarks of cancer. **Cell** 100: 57-70, 2000.

HARDMAN, W. E. (n-3) Fatty acids and cancer therapy. **J. Nutr.** 134: 3427S-3430S, 2004.

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

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

IAGHER, F. Efeito da suplementação conjunta crônica com óleo de fígado de tubarão e óleo de peixe sobre crescimento tumoral, caquexia e atividade linfocitária de ratos wistar portadores de tumor de walker 256. **Tese de Doutorado**, UFPR, 2008.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil). **Fisiopatologia do câncer.** In: Ações de enfermagem para o controle do câncer. 2. ed. Rio de Janeiro: INCA, 2002. p.52.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil). INCA. Estimativa 2012. Disponível em: <[www.inca.gov.br/estimativa/2012](http://www.inca.gov.br/estimativa/2012)> acesso em: 09.Out.2012.

IRIGARAY, P., NEWBY, J.A., CLAPP, R., HARDELL, L., HOWARD, V., MONTAGNIER, L., EPSTEIN, S., BEMPOMME, D. Lifestyle-related factors and environmental agents causing cancer: an overview. **Biomed. Pharmacother** 61: 640–58, 2007.

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

JEEVANANDAM. M., HOROWITZ, G.D., LOWRY, S.F., et al. Cancer cachexia and the rate of whole body lipolysis in man. **Metabolism** 35: 304–310, 1986.

JEMAL, A., SIEGEL, R., WARD, E., MURRAY, T., XU, J., THUN, J. Cancer statistics 2007. **CA Cancer J. Clin** 57: 43–66, 2007.

JIANG, Y., WOOLLARD, A.C.S., WOLFF, S.P. Lipid Hydroperoxide Measurement by Oxidation of Fe<sup>+2</sup> in the Presence of Xilenol Orange. Comparison with the TBA Assay and an Iodometric Method. **Lipids** 26:853-856, 1991.

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

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

JIN, Z., EL-DEIRY, W.S. Overview of cell death signaling pathways. **Cancer Biology & Therapy** 4 (2): 139-163, 2005.

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

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.

KLEIN, S., WOLFE, R.R. Whole-body lipolysis and triglyceride-fatty acid cycling in cachectic patients with esophageal cancer. **J Clin Invest** 86: 1403–1408, 1990.

KONTOU, N. *et al.* The Mediterranean diet in cancer prevention: a review. **Journal of Medicinal Food.** p.01–14, 2011. In press.

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

KROMANN, N.; GREEN, A. Epidemiological studies in the Upernavik District, Greenland. Incidence of some chronic diseases 1950-1974. **Acta Medica Scandinavica.** 208 (5): 401-406, 1980.

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

KUCZERA, D. Suplementação crônica da dieta com  $\beta$ -hidróxi- $\beta$ -metilbutirato (HMB) e treinamento contra-resistido reduzem a taxa de crescimento do tumor de Walker 256. **Dissertação de Mestrado**, UFPR, Paraná, 2007.

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

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** 96:450-4, 2004.

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

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

LUCIA, A., EARNEST, C., PEREZ, M. Cancer-related fatigue: can exercise physiology assist oncologists? **Lancet Oncol** 1:616–25, 2003.

MACDONALD, N., EASSON, A.M., MAZURAK, V.C., DUNN, G.P., BARACOS, V.E. Understanding and managing cancer cachexia. **J Am Coll Surg** 197:143–61, 2003.

McCUSKER, M. M.; GRANT-KELS, J. M. Healing fats of the skin: the structural and immunologic roles of the  $\omega$ -6 and  $\omega$ -3 fatty acids. **Clinics in Dermatology**. 28: 440–451, 2010.

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

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

MANNA, S., CHAKRABORTY, T., GHOSH, B., CHATTERJEE, M., PANDA, A., SRIVASTAVA, S., RANA, A., CHATTERJEE, M. Dietary fish oil associated with increased apoptosis and modulated expression of Bax and Bcl-2 during 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary carcinogenesis in rats. **Elsevier** 79: 5-14, 2008.

MANTOVANI, G., MACCIO, A., MADEDDU, C., GRAMIGNANO, G., LUSSO, M.R., SERPE, R., MASSA, E., ASTARA, G., DEIANA, L. A phase II study with antioxidants, both in the diet and supplemented, pharmacnutritional support, progestagen, and anti-cyclooxygenase-2 showing efficacy and safety in patients with cancer-related anorexia/cachexia and oxidative stress. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 15:1030–1034, 2006.

MAZZOTTA, P.; JENEY, C. M. Anorexia-Cachexia syndrome: a systematic review of the role of dietary polyunsaturated fatty acids in the management of

symptoms, survival, and quality of life. **J. Pain Symptom. Manage.** 37 (6): 1069-1077, 2008.

MELVILLE, S., MCNURLAN, M.A., CALDER, A.G., et al. Increased protein turnover despite normal energy metabolism and responses to feeding in patients with lung cancer. **Cancer Res** 50: 1125–1131, 1990.

MINUZZI, L.G. Estudo da associação do exercício físico e da suplementação com óleo de peixe sobre crescimento tumoral, caquexia e imunidade em ratos com tumor de Walker 256. **Dissertação de Mestrado**, UFPR, 2006.

MUEHLMANN, L. A. Suplementação da dieta com lecitina de soja aumenta a produção de lipídios com atividade de paf (paf-like) nos pulmões de ratos Wistar asmáticos. **Dissertação de Mestrado**, UFPR, 2008.

MUND, R.C.; PIZZATO, N.; BONATTO, S.; NUNES, E.; VICENZI, T.; TANHOFFER, T.; OLIVEIRA, H.P.; CURI, R.; CALDER, P.C.; FERNANDES, L.C. Decreased tumor growth in Walker 256 tumor-bearing rats chronically supplemented with fish oil involves COX-2 and PGE2 reduction associated with apoptosis and increased peroxidation. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, 76 (2): 113-120, 2007.

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  $\beta$ -hidróxi- $\beta$ -metilbutirato (HMB) sobre o crescimento tumoral, caquexia e parâmetros imunitários de ratos portadores do tumor de Walker 256. **Dissertação de Mestrado**, UFPR, 2005.

NUNES, E. A, NAVARRO, F., BACURAU, R.F.P., PONTES JUNIOR, F.L., FERNANDES, L.C. Mecanismos potenciais pelos quais o treinamento de força

pode afetar a caquexia em pacientes com câncer. **Revista Brasileira de Prescrição e Fisiologia do Esforço** 1 (1): 1-17, 2007.

OLTVAI, Z.N., MILLIMAN, C.L., KORSMEYER, S.J. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. **Cell** 74: 609-614, 1993.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Ask the expert: Online Q&A. 1 April 2008. Are the number of cancer cases increasing or decreasing in the world? Disponível em: <http://www.who.int/features/qa/15/en/index.html>. Acesso em: 09. Out.2012.

PASTERNAK, J. J. **Genética Molecular Humana. Mecanismos de Doenças hereditárias**. São Paulo: Manole 1ed., 2002.

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

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

PESSINI, C. Efeitos da associação de exercício físico e suplementação com  $\beta$ -hidróxi- $\beta$ -metilbutirato (HMB) sobre o crescimento tumoral e caquexia em ratos portadores de tumor. **Dissertação de Mestrado**, UFPR, Paraná, 2007.

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

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

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.J.R.; 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. **Nutrition and Cancer.** 53: 194-201, 2005.

POPKIN, B. M. Understanding global nutrition dynamics as a step towards controlling cancer incidence. **Nature Reviews. Cancer.** 7: 61 – 67, 2007.

RATNAYAKE, W. M. N.; GALLI, C. Fat and fatty acid terminology, methods of analysis and fat digestion and metabolism: a background review paper. **Ann. Nutr. Metab.,** 55: 08–43, 2009.

REED, J.C. Bcl-2–family proteins and hematologic malignancies: history and future prospects. **Blood** 111: 3322-3330, 2008.

RICHARDS, E.W., LONG, C.L., NELSON, K.M., et al. Protein turnover in advanced lung cancer patients. **Metabolism** 42: 291–296, 1993.

RIEDIGER, N. D. *et al.* A systemic review of the roles of n-3 fatty acids in health and disease. **J. Am. Diet. Assoc.** 109: 668-679, 2009.

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

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

ROSA, L.F.B.P.C. Exercise as a Time-conditioning Effector in Chronic Disease: a Complementary Treatment Strategy. **Evid Based Complement Alternat Med** 1 (1): 63–70, 2004.

SCHIESSEL, Dalton Luiz. Ácido graxo  $\alpha$ - linolênico causa o mesmo efeito que seus derivados de cadeia longa em ratos portadores de tumor de Wlaker 256? Investigação antitumorial e imunitária. **Tese de Doutorado**. UFPR, 2011.

SCHORR, K., LI, M., BAR-PELED, U. et al., Gain of Bcl-2 is more potent than Bax loss in regulating mammary epithelial cell survival in vivo **Cancer Res** 59: 2541–2545, 1999.

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

SCULLY, J., FIELD K., TANZAWA H. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma (SCCHN): 1. carcinogen metabolism, DNA repair and cell cycle control. **Oral Oncology** 36, 2000.

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

SHAW, J.H.F., WOLFE, R.R. Glucose and urea kinetics in patients with early and advanced gastrointestinal cancer: The response to glucose infusion, parenteral feeding, and surgical resection. **Surgery** 101: 181-91, 1997.

SHORS, A. R., SOLOMON, C., MCTIERNAN, A., WHITE, E. Melanoma risk in relation to height, weight, and exercise (United States). **Cancer Causes Control**. 12: 599-606, 2001.

SILVA, Marcos Damiano Alves da. Análise da expressão de proteínas da família BCL-2 em Linfomas Não-Hodgkin. **Tese de Doutorado**. Unicamp, 1999.

SIMOPOULOS, A.P. Omega-3 fatty acids and cancer. **Indoor and Built Environment** 12: 370-405, 2003.

SIMOPOULOS A.P. Nutrigenetics/Nutrigenomics. **Annu Rev Public Health** 31: 22-1.22-16, 2010.

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

SMITH, J.A.; GRAY, A.B.; PYNE, D.B.,; BAKER, M.S.; TELFORD, R.D.; WEIDEMANN, M.J. Moderate exercise triggers both priming and activation of neutrophil subpopulations. **Am J Physiol**. 270: 838-45, 1996.

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

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

STOLL, B.A. N-3 fatty acids and lipid peroxidation in breast cancer inhibition. **Br J Nutr** 87:193–198, 2002.

STRASSER, F., BRUERA, E.D. Update on anorexia and cachexia. **Hem Clin N Am** 16:589-617, 2002.

SURETTE, M.E. The Science behind dietary omega-3 fatty acids. **CMAJ** 178(2): 177-180, 2008.

TAPIERO, H.; NGUYEN BA, G.; COUVREUR, P.; TEW, K.D. Polyunsaturated fatty acids and eicosanoids in human health and pathologies. **Biomedicin Pharmacotherapy**. 56: 215-222, 2002.

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

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

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

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

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

TISDALE, M. J. Mechanisms of cancer cachexia. **Physiol. Rev.** 89: 381–410, 2009.

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

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

TYMCHUK CN, TESSLER SB, ARONSON WJ, AND BARNARD RJ. Effects of diet and exercise on insulin, sex hormone-binding globulin, and rostatespecific antigen. **Nutr. Cancer** 31: 127.131, 1998.

VALENTI, M., PORZIO, G., AIELLI, F., VERNA, L., CANNITA, K., MANNO, R., MASEDU, F., MARCHETTI, P., FICORELLA, C. Physical Exercise and Quality of Life in Breast Cancer Survivors **Int. J. Med. Sci** 5(1):24-28, 2008.

VOLTARELLI, F.A., MELLO, M.A.R., DUARTE, J.A.R. Apoptose e exercício físico: efeitos sobre o músculo esquelético. **Rev Bras Cineantropom Desempenho Hum** 10(1): 100-105, 2008.

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

WANG, X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. **Genes Dev** 15: 2922-33, 2001.

WESTERLIND, K. C. Physical Activity And Cancer Prevention - Mechanisms. **Medicine and Science in Sports and Exercise**. 35 (11): 1834-1840, 2003.



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

WIGMORE, S.J., BARBER, M.D., ROSS, J.A., TISDALE, M.J, FEARON, K.C. Effect of oral eicosapentaenoic acid on weight loss in patients with pancreatic cancer. **Nutr Cancer** 36:177–184, 2000.

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

YAN, N., SHI, Y. Mechanisms of apoptosis through structural biology. **Annu Rev Cell Dev Biol** 21:35-36, 2005.

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

YIN, X.M., OLTVAI, Z.N., KORSMEYER, S.J. BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax. **Nature** 369: 321-325, 1994.

ZIELINSKI, M. R.; MUENCHOW, M.; WALLIG, M. A.; HORN, P. L.; WOODS, J. A. Exercise delays allogeneic tumor growth and reduces intratumoral inflammation and vascularization. **Journal of Applied Physiology**. 96: 2249-2256, 2004.

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

ZUIJDEEST-VAN, LEEUWEN, S.D., VAN DEN BERG, J.W., WATTIMENA, J.L., et al. Lipolysis and lipid oxidation in weight-losing cancer patients and healthy subjects. **Metabolism** 49:931–936, 2000.

**ANEXOS**



Ministério da Educação  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
Setor de Ciências Biológicas  
Comitê de Ética em Experimentação Animal  
(CEEA)



Nº 445

## CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituído pela PORTARIA Nº 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEEA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO Nº 01/03-BL, de 09 de maio de 2003 e considerando o contido no Regimento Interno do CEEA, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado, estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em "*Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)*".

## CERTIFICATION

The Ethics Animal Experiment Committee of the Setor de Ciências Biológicas of the Federal University of Paraná, established by the DECREE Nº 787/03-BL on June 11th 2003, based upon the RESOLUTION Nº 01/03-BL from May 9th 2003, and upon the CEEA internal regiment, **CERTIFIES** that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the ethical principals established by the Experimental Animal Brazilian Council (COBEA), and with the requirements of the "*Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)*".

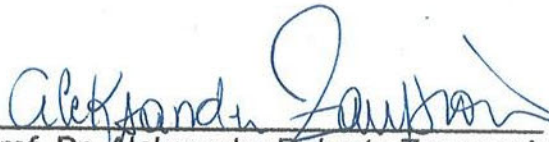
**PROCESSO:** 23075.014430/2010-11

**APROVADO:** 06/05/2010 – R.O. 04/2010

**TÍTULO:** Efeito do treinamento de salto associado à suplementação com óleo de peixe sobre crescimento tumoral, caquexia e vias de sinalização celular

**AUTORES:** Luis Claudio Fernandes, Renata Teixeira Mamus Gomes, Marcelo Kryczyk, Ricardo K. Yamazaki, Julia Aikawa, Gleisso

**DEPARTAMENTO:** Fisiologia

  
Prof. Dr. Aleksander Roberto Zampronio  
Coordenador do CEEA

## ANEXO 02

**TABELA 2:** Resumo dos dados: Glicemia, Lactato e TAGs.

	<b>Glicemia</b>	<b>Lactato</b>	<b>TAGs</b>
	<b>(mg/dL)</b>	<b>(mmol/L)</b>	<b>(mg/dL)</b>
<b>S</b>	74,98 ± 1,79	1,34 ± 0,03	42,73 ± 7,21
<b>SO</b>	82,00 ± 2,71	1,31 ± 0,04	48,80 ± 6,42
<b>EX</b>	81,97 ± 2,25	1,30 ± 0,04	37,14 ± 3,06
<b>EXO</b>	79,84 ± 2,86	1,25 ± 0,04	35,18 ± 0,71
<b>SW</b>	57,70 ± 0,91	1,49 ± 0,01	183 ± 21,19
<b>SWO</b>	67,42 ± 2,36	1,37 ± 0,02	52,31 ± 5,86
<b>EXW</b>	71,32 ± 1,97	1,34 ± 0,02	67,46 ± 4,14
<b>EXWO</b>	71,24 ± 2,46	1,37 ± 0,02	60,55 ± 5,26