FABIO SANTOS DE LIRA

**EFEITO DA CAQUEXIA ASSOCIADA AO
CÂNCER SOBRE O BALANÇO DE CITOCINAS ANTI
E PRÓ-INFLAMATÓRIAS NO TECIDO ADIPOSEO DE
RATOS TREINADOS**

**Dissertação apresentada ao Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade de
São Paulo, para a obtenção do título de
Mestre em Ciências (Biologia Celular e
Tecidual).**

**São Paulo
2008**

FABIO SANTOS DE LIRA

**EFEITO DA CAQUEXIA ASSOCIADA AO
CÂNCER SOBRE O BALANÇO DE CITOCINAS
ANTI E PRÓ-INFLAMATÓRIAS NO TECIDO
ADIPOSO DE RATOS TREINADOS**

**Dissertação apresentada ao Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade de
São Paulo, para a obtenção do título de
Mestre em Ciências (Biologia Celular e
Tecidual).**

**Área de concentração: Biologia Celular e
Tecidual**

**Orientadora: Profa. Dra. Marília Cerqueira
Leite Seelaender**

**Co-Orientador: Prof. Dr. Miguel Luis
Batista Jr**

**São Paulo
2008**

DEDICATÓRIA

**A minha mãe Jaci, meu pai Lira, minhas irmãs
Luciana e Andréia e meu irmão Cristiano, por
tudo o que fizeram por mim.**

**A minha futura esposa Sabrina, pela compreensão
e amor.**

Ao grupo de “neuroimunoendócrino”.

AGRADECIMENTOS

A Professora Dra. Marília Cerqueira Leite Seelaender, pela paciência, amizade, mais que isso, por ter acreditado no meu potencial.

Aos amigos do Laboratório de Lípidos, a “velho guarda” André Amaral (Terrinha), Melissa (Mel), Waldecir (Walder), Flávia Regina (Flavinha); Priscila Santos Donghia (Pri) e a “nova geração” Robson Eder (Rodela), Daniela Caetano (Dani), Luiz Carlos Carnevali (Gringo), Fabio Luiz Tavares (Dedada), Michel Dacar, Renata Silvério (Rê), Adriana Passanha (Dri), Michele Joana e Cristiane Koyama (Cris).

Aos amigos do Laboratório de Metabolismo, Ronaldo Wagner Tomatelli dos Santos (Ronaldinho), Ana Carolina Ferreira (Carol), Anielle (Ani), Marcus Vinícius (Vini), Fernanda Bredariol (Fê), Daniel (Bob), Hélio, Cida, Érico Caperuto Chagas (Ericão), Marco Carlo Uchida (Uchida), Graziela (Grazielinha), Gabriela Chamusca (Bia) e ao Prof. GG.

Aos amigos, Alex Shimura Yamashita, Miguel Luiz Batista Junior, José César Rosa Neto, Emília Ribeiro, Nelo Eidy Zanchi, Wilton Darlens dos Santos, Eivor Martins Junior, Valéria Panissa, Pedro Lorena Bezerra, Leandro Ribeiro Marques, Cássio Couto Moraes, Juvêncio (Juca) e Rodrigo Fermino.

Ao pessoal do Laboratório do Prof. Emer; Denise, Fernanda, Lillian, Leandro, Sayami, e o próprio Emer.

Ao pessoal do Laboratório da Prof^a Dra Marinilce; Erica Costa, Marcelo Lamers, Talita (TITA), Mara Rúbia Marques, Virginia e Adriana Sbampato.

Ao pessoal do Laboratório da Prof^a. Alison; Karina, Marcel, Juliano, Priscila Peron e ao Prof. Bauer.

A todos aqueles, professores, funcionários do ICB, pessoal da xerox, que de certa forma, participaram de nossa formação nesses anos de ICB, desde a iniciação científica. Não ousaria sequer citar um por um, pois foram tantos e não quero cometer uma gafe, que neste momento seria imperdoável.

RESUMO

LIRA, F.S. **Efeito da caquexia associada ao câncer sobre o balanço de citocinas anti e pró-inflamatórias no tecido adiposo de ratos treinados**. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

O tecido adiposo (TA) é severamente afetado pela caquexia associada ao câncer. O treinamento aeróbio moderado modula o conteúdo de citocinas no tecido adiposo. O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da síndrome da caquexia associada ao câncer sobre o balanço de citocinas anti e pró-inflamatórias no tecido adiposo de animais treinados. Animais machos da linhagem Wistar ($150 \pm 200\text{g}$) foram divididos em seis grupos: sedentário controle (SC), sedentário tumor (ST), sedentário *pair-fed* ou treinado controle (TC), treinado tumor (TT) e treinado *pair-fed* (TPF). Os animais foram treinados em esteira rolante ($60\%\text{VO}_{2\text{máx}}$) por 60min/dia, 5 vezes/semana, durante 8 semanas. Os depósitos de tecido adiposo retroperitoneal (TARP) e mesentérico (TAME) foram analisados o mRNA por RT-PCR (TNF- α , IL-1 β , IL-10 e PPAR- γ). O conteúdo tecidual das citocinas (TNF- α , IL-1 β e IL-10) foi analisado por ELISA. No TAME, mRNA para TNF- α foi aumentado no ST ($p<0.05$) em relação ao SC, sem alteração da expressão protéica. Todas as citocinas (TNF- α , IL-1 β e IL-10) analisadas por ELISA no TARP mostraram-se aumentadas no ST em relação ao SC e SPF ($p<0.05$). Tais alterações não foram encontradas quando os animais eram submetidos ao protocolo de treinamento aeróbio. Conclusão: A caquexia associada ao câncer afeta o tecido adiposo, direcionando-o a um estado pró-inflamatório. A adoção do protocolo de treinamento preveniu esse quadro.

Palavras-chave: Treinamento aeróbio; Câncer, Caquexia; Tecido adiposo; Citocinas; Inflamação.

ABSTRACT

LIRA, F.S. Effect of cancer cachexia upon the balance of anti and pro-inflammatory cytokines in the adipose tissue of trained rats. Dissertation (PhM) - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

The adipose tissue (AT) is severely affected by cancer-cachexia. Moderate endurance training modulates cytokines levels in adipose tissue. We tested the influence of cancer-cachexia upon the balance of anti and pro-inflammatory cytokines production in the adipose tissue of trained rats. Animals were randomly assigned to a sedentary control (SC), sedentary tumour-bearing (ST), sedentary pair-fed (SPF) or trained control (TC), trained tumour-bearing (TT) and trained pair-fed (TPF) group. Trained rats ran on a treadmill ($60\%VO_{2max}$) for 60min/day, 5 days/week, for 8 weeks. Retroperitoneal (RPAT) and mesenteric (MEAT) adipose tissue mRNA expression was analyzed (TNF- α , IL-1 β , IL-10 and PPAR- γ) by RT-PCR. Tissue cytokine levels (TNF- α , IL-1 β and IL-10) were assessed by ELISA. In MEAT, TNF- α mRNA was increased in ST ($p<0.05$) in relation to SC, with no changes in this protein expression. Cytokine (TNF- α , IL-1 β and IL-10) levels assessed in RPAT were increased in ST in relation to SC and SPF ($p<0.05$). These parameters were restored to control values when the animals were submitted to the training protocol. Conclusion: Walker-256 tumour cachexia affected the adipose tissue inducing an pro-inflammatory state. Endurance training prevented the installation of one such state.

Key-words: Endurance training; Cancer, Cachexia; Adipose tissue; Cytokine; Inflammation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Ingestão alimentar cumulativa durante a progressão do tumor (14 dias), nos ratos sedentários controle (SC), sedentários portadores do tumor de Walker 256 (ST), treinados controle (TC) e treinados portadores do tumor de Walker 256 (TT).

.....44

Figura 2 – Concentração sérica de Leptina nos ratos sedentários controle (SC), sedentários portadores do tumor de Walker 256 (ST), sedentários *pair-fed*, treinados controle (TC), treinados portadores do tumor de Walker 256 (TT) e treinados *pair-fed*.

.....45

Figura 3 – Concentração sérica de Corticosterona nos ratos sedentários controle (SC), sedentários portadores do tumor de Walker 256 (ST), sedentários *pair-fed*, treinados controle (TC), treinados portadores do tumor de Walker 256 (TT) e treinados *pair-fed*.

.....46

Figura 4 – RT-PCR do gene TNF- α no TARP nos ratos sedentários controle (SC), sedentários portadores do tumor de Walker 256 (ST), sedentários *pair-fed*, treinados controle (TC), treinados portadores do tumor de Walker 256 (TT) e treinados *pair-fed*.

.....47

Figura 5 – Quantificação do conteúdo de TNF- α no TARP nos ratos sedentários controle (SC), sedentários portadores do tumor de Walker 256 (ST), sedentários *pair-fed*, treinados controle (TC), treinados portadores do tumor de Walker 256 (TT) e treinados *pair-fed*.

.....48

Figura 6 – RT-PCR do gene TNF- α no TAME nos ratos sedentários controle (SC), sedentários portadores do tumor de Walker 256 (ST), sedentários *pair-fed*, treinados controle (TC), treinados portadores do tumor de Walker 256 (TT) e treinados *pair-fed*.

.....49

Figura 7 – Quantificação do conteúdo de TNF- α no TAME nos ratos sedentários controle (SC), sedentários portadores do tumor de Walker 256 (ST), sedentários *pair-fed*, treinados controle (TC), treinados portadores do tumor de Walker 256 (TT) e treinados *pair-fed*.

.....50

Figura 8 – RT-PCR do gene IL-1 β no TARP nos ratos sedentários controle (SC), sedentários portadores do tumor de Walker 256 (ST), sedentários *pair-fed*, treinados controle (TC), treinados portadores do tumor de Walker 256 (TT) e treinados *pair-fed*.

.....51

Figura 9 – Quantificação do conteúdo da IL-1 β no TARP nos ratos sedentários controle (SC), sedentários portadores do tumor de Walker 256 (ST), sedentários *pair-fed*, treinados controle (TC), treinados portadores do tumor de Walker 256 (TT) e treinados *pair-fed*.

.....52

Figura 10 – RT-PCR do gene IL-1 β no TAME nos ratos sedentários controle (SC), sedentários portadores do tumor de Walker 256 (ST), sedentários *pair-fed*, treinados controle (TC), treinados portadores do tumor de Walker 256 (TT) e treinados *pair-fed*.

.....53

Figura 11 – Quantificação do conteúdo da IL-1 β no TAME nos ratos sedentários controle (SC), sedentários portadores do tumor de Walker 256 (ST), sedentários *pair-fed*, treinados controle (TC), treinados portadores do tumor de Walker 256 (TT) e treinados *pair-fed*.

.....54

Figura 12 – RT-PCR do gene IL-10 no TARP nos ratos sedentário controle (SC), sedentário portador do tumor de Walker 256 (ST), sedentário *pair-fed*, treinado controle (TC), treinado portador do tumor de Walker 256 (TT) e treinado *pair-fed*.

.....55

Figura 13 – Quantificação do conteúdo da IL-10 no TARP nos ratos sedentário controle (SC), sedentário portador do tumor de Walker 256 (ST), sedentário *pair-fed*, treinado controle (TC), treinado portador do tumor de Walker 256 (TT) e treinado *pair-fed*.

.....56

Figura 14 - RT-PCR do gene IL-10 no TAME nos ratos sedentário controle (SC), sedentário portador do tumor de Walker 256 (ST), sedentário *pair-fed*, treinado controle (TC), treinado portador do tumor de Walker 256 (TT) e treinado *pair-fed*.

.....57

Figura 15 - Quantificação do conteúdo da IL-10 no TAME nos ratos sedentários controle (SC), sedentários portadores do tumor de Walker 256 (ST), sedentários *pair-fed*, treinados controle (TC), treinados portadores do tumor de Walker 256 (TT) e treinados *pair-fed*.

.....58

Figura 16 - Taxa IL-10/TNF- α no TARP ratos sedentários controle (SC), sedentários portadores do tumor de Walker 256 (ST), sedentários *pair-fed*, treinados controle (TC), treinados portadores do tumor de Walker 256 (TT) e treinados *pair-fed*.

.....59

Figura 17 - Participação relativa de cada citocina na taxa IL-10/TNF- α no TARP, nos ratos sedentários controle (SC), sedentários portadores do tumor de Walker 256 (ST), sedentários *pair-fed*, treinados controle (TC), treinados portadores do tumor de Walker 256 (TT) e treinados *pair-fed*.

.....60

Figura 18 - Taxa IL-10/TNF- α no TAME nos ratos sedentários controle (SC), sedentários portadores do tumor de Walker 256 (ST), sedentários *pair-fed*, treinados controle (TC), treinados portadores do tumor de Walker 256 (TT) e treinados *pair-fed*.

.....61

Figura 19 - Participação de cada citocina na taxa IL-10/TNF- α no TAME, nos ratos sedentários controle (SC), sedentários portadores do tumor de Walker 256 (ST), sedentários *pair-fed*, treinados controle (TC), treinados portadores do tumor de Walker 256 (TT) e treinados *pair-fed*.

.....62

Figura 20 - RT-PCR do gene PPAR- γ no TARP nos ratos sedentários controle (SC), sedentários portadores do tumor de Walker 256 (ST), sedentários *pair-fed*, treinados controle (TC), treinados portadores do tumor de Walker 256 (TT) e treinados *pair-fed*.

.....63

Figura 21 - RT-PCR do gene PPAR- γ no TAME nos ratos sedentários controle (SC), sedentários portadores do tumor de Walker 256 (ST), sedentários *pair-fed*, treinados controle (TC), treinados portadores do tumor de Walker 256 (TT) e treinados *pair-fed*.

.....64

Figura 22 - Imunohistoquímica para MHC de classe II, evidenciando presença de macrófagos infiltrados no TARP, nos ratos sedentários portadores do tumor de Walker 256 (ST) e treinados portadores do tumor de Walker 256 (TT).

.....65

Figura 23 - Imunohistoquímica para MHC de classe II, evidenciando presença de macrófagos infiltrados no TAME, nos ratos sedentários portadores do tumor de Walker 256 (ST) e treinados portadores do tumor de Walker 256 (TT).

.....66

Figura 24 - Quantificação dos macrófagos infiltrados no TARP nos ratos sedentários portadores do tumor de Walker 256 (ST) e treinados portadores do tumor de Walker 256 (TT).

.....67

Figura 25 - Quantificação dos macrófagos infiltrados no TAME nos ratos sedentários portadores do tumor de Walker 256 (ST) e treinados portadores do tumor de Walker 256 (TT).

.....68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Protocolo de treinamento semanal para ratos em esteira ergométrica.	32
Tabela 2 – Sequência dos <i>primers</i> do RT-PCR.	37

LISTA DE ABREVIATURAS

DEPC:	dietilpirocarbonato
DTT:	ditiotreitól
EDTA:	ácido etilenodiaminotetracético
ELISA:	<i>Enzyme-linked immunoabsorbent assay</i>
I κ B:	proteína inibitória kappa B
IKK:	complexo I κ B quinase
IL:	interleucinas
IL-1 β :	interleucina 1 beta
IL-10R:	receptor de membrana para IL-10
IL-1ra:	receptor antagonista da interleucina 1
LPS:	lipopolissacarídeo
MCP-1:	proteína quimioatratante de monócitos 1
MØ:	macrófago
mRNA:	RNA mensageiro
NF κ B:	fator de transcrição nuclear κ B
PBS:	tampão salina fosfato
PCR:	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
PPAR- γ :	receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama
RIE:	radioimunoensaio
RNA:	ácido ribonucleico
RsTNF:	receptor solúvel para o TNF
RTNF:	receptor de membrana para o TNF
RT-PCR:	<i>Reverse Transcriptase – Polimerase Chain Reaction</i>
TACE:	enzima conversora de TNF- α

TAME:	tecido adiposo mesentérico
TARP:	tecido adiposo retroperitoneal
TBE:	tris-borato-EDTA
TNF:	fator de necrose tumoral
VO _{2max} :	consumo máximo de oxigênio
RPL-19:	proteína ribossomal L 19

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	19
2 REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1 Caquexia, citocinas e ativação da via inflamatória.....	22
2.2 Tecido adiposo e caquexia associada ao câncer	24
2.3 Treinamento aeróbio e citocinas anti e pro-inflamatórias	26
3 OBJETIVO.....	29
3.1 Geral.....	29
3.2 Específico	29
4 MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1 Reagentes	30
4.2 Animais	30
4.3 Ingestão Alimentar	31
4.4 Desenho experimental.....	31
4.4.1 Descrição dos grupos experimentais	31
4.5 Protocolo de treinamento aeróbio moderado	32
4.6 Coleta do material a ser estudado após o sacrifício dos animais.....	33
4.6.1 Procedimentos gerais.....	33
4.7 Obtenção e homogeneização dos tecidos.....	33
4.8 Obtenção do plasma.....	33
4.9 Quantificação das citocinas teciduais.....	34
4.9.1 Determinação da concentração de proteínas totais do homogeneizado	34
4.9.2 <i>Enzyme-linked immunoabsorbent assay</i> (ELISA)	34
4.10 Quantificação da expressão dos genes das citocinas teciduais.....	35
4.10.1 Extração de RNA	35

4.10.2 Transcrição Reversa (RT)	36
4.10.3 Seleção dos <i>primers</i>	37
4.10.4 Reações de PCR (semi quantitativo)	39
4.11 Parâmetros plasmáticos.....	39
4.11.1 Radioimunoensaio (RIE) para corticosterona	39
4.11.2 Radioimunoensaio (RIE) para Leptina.....	40
4.12 Imunolocalização de Macrófagos	41
4.12.1 Perfusão	41
4.12.2 Obtenção e processamento do tecido	41
4.12.3 Desparafinização/Hidratação	41
4.12.4 Reação de Imunohistoquímica.....	42
4.13 Contagem dos macrófagos infiltrados no tecido adiposo	42
4.14 Análise estatística	43
5 RESULTADOS	44
5.1 Ingestão alimentar cumulativa durante a vigência do tumor	44
5.2 Concentração sérica de Leptina	45
5.3 Concentração sérica de Corticosterona	46
5.4 RT-PCR do gene TNF- α no TARP	47
5.5 Quantificação do conteúdo de TNF- α no TARP	48
5.6 RT-PCR do gene TNF- α no TAME	49
5.7 Quantificação do conteúdo de TNF- α no TAME.....	50
5.8 RT-PCR do gene IL-1 β no TARP.....	51
5.9 Quantificação do conteúdo da IL-1 β no TARP.....	52
5.10 RT-PCR do gene IL-1 β no TAME	53
5.11 Quantificação do conteúdo da IL-1 β no TAME.....	54

5.12 RT-PCR do gene IL-10 no TARP.....	55
5.13 Quantificação do conteúdo da IL-10 no TARP	56
5.14 RT-PCR do gene IL-10 no TAME.....	57
5.15 Quantificação do conteúdo da IL-10 no TAME.....	58
5.16 Taxa IL-10/TNF- α no TARP	59
5.17 Participação de cada citocina na taxa IL-10/TNF- α no TARP	60
5.18 Taxa IL-10/TNF- α no TAME	61
5.19 Participação de cada citocina na taxa IL-10/TNF- α no TAME	62
5.20 RT-PCR do gene PPAR- γ no TARP	63
5.21 RT-PCR do gene PPAR- γ no TAME	64
5.22 Imunohistoquímica para MHC de classe II no TARP	65
5.23 Imunohistoquímica para MHC de classe II no TAME	66
5.24. Quantificação do número de macrófagos infiltrados no TARP	67
5.25 Quantificação do número de macrófagos infiltrados no TAME	68
6 DISCUSSÃO.....	69
7 CONCLUSÃO	80
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81

1 INTRODUÇÃO

Cerca de 50-80% dos pacientes portadores de câncer apresentam o quadro da síndrome da caquexia, que induz no organismo intensa depleção da massa magra e dos depósitos de gordura (MACHADO et al., 2004; BRUERA et al., 1997). Ela é um fenômeno clínico clássico, que evoca a imagem histórica de leitos hospitalares com pacientes sendo progressivamente “consumidos”. Trata-se de uma síndrome multifacetada, de etiologia extremamente complexa, diretamente relacionada à redução da sobrevida e à prognose adversa (KAZANTZIS e SEELANDER, 2005).

A síndrome da caquexia é um estado metabólico que apresenta como características, anorexia, perda de peso, astenia, anemia, anormalidades do metabolismo intermediário que incluem uma anormal utilização dos substratos energéticos pelo organismo, prejuízo na absorção intestinal, balanço nitrogenado e calórico negativos, degradação de proteínas teciduais, perda de água e eletrólitos e uma consequente degeneração do organismo do paciente (ARGILES e LOPEZ-SORIANO, 1997; SEELAENDER et al., 1999).

O tecido adiposo sofre importantes modificações em decorrência do estado da caquexia. Resultados prévios do nosso grupo indica modificação na composição dos ácidos graxos e aumento na dimensão dos adipócitos do tecido adiposo mesentérico e retroperitoneal nos animais caquéticos em relação aos animais controle (BERTEVELLO e SEELAENDER, 2001) e diminuição na concentração plasmática de insulina (FERNANDES et al., 1990). Sabidamente, a instalação deste quadro induz aumento no conteúdo de proteínas relacionadas ao quadro inflamatório, como no caso do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e de seus receptores (TNFR1 e TNFR2) no tecido adiposo. Este aumento pode contribuir para o agravamento da inflamação sistêmica (FIGUEIRAS et al., 2005).

Há alguns anos foi descoberto que o tecido adiposo não é um simples compartimento de armazenamento de energia. A este respeito já foi demonstrado que suas células são capazes de secretar moléculas (leptina e adiponectina, por exemplo) que atuam como hormônios tendo ação em vários tecidos, tanto em animais como em seres humanos (ZHANG et al., 1994). Essa propriedade do tecido adiposo permite uma interação com outros órgãos, bem como com outras células adiposas (WAJCHENBERG, 2000).

Os diferentes depósitos de tecido adiposo apresentam características distintas, desde a composição de seus ácidos graxos até sua funcionalidade fisiometabólica (POND, 1999). Por exemplo, o tecido adiposo retroperitoneal é considerado um importante depósito energético, tendo também grande importância para o fornecimento de ácido graxos em situações de privação energética e/ou aumento da demanda energética (ENEVOLDSEN et al., 2001; YAMASHITA et al., 2008). Em contrapartida, o tecido adiposo mesentérico é um depósito anatomicamente íntimo aos linfonodos, relacionados à resposta inflamatória (GOTTSCHLING-ZELLER et al., 2000; POND, 2003). Os diferentes depósitos do tecido adiposo não são constituídos somente de adipócitos, mas neles estão também presentes fração estromal vascular, células endoteliais, fibroblastos e macrófagos, entre outros componentes (TRAYHURN e BEATTIE, 2001).

O tecido adiposo, tanto de animais quanto de pacientes caquéticos, apresenta alterações na sua composição estrutural e na produção de proteínas (BETERVELLO e SEELAENDER, 2001; MACHADO et al., 2004). Estudos prévios do grupo da Prof^a Seelaender mostraram diminuição na concentração de leptina plasmática e de sua concentração no tecido adiposo de animais caquéticos (MACHADO et al., 2004). Estas alterações foram concomitantes à presença de células infiltradas (macrófagos) no tecido adiposo. Assim, essas células infiltradas no tecido adiposo podem ter papel relevante nas alterações encontradas neste depósito, pois foi mostrado que esses são importantes produtores de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α e PGE2 (MACHADO et al., 2004). Além dos macrófagos infiltrados no tecido adiposo, os próprios adipócitos podem produzir concentrações elevadas tanto de TNF- α (dito um fator pró-inflamatório) como também de secretar concentrações elevadas de IL-10 (considerado fator anti-inflamatório). Essas flutuações dependem essencialmente do estímulo recebido (COPPAK, 2001; TRAYHURN, 2005; JUGE-AUBRY et al., 2005). Desta forma, propõe-se que as complicações associadas à gravidade da caquexia parecem estar intimamente ligadas a um balanço de proteínas pró e anti-caquéticas (ARGILES et al., 1999). Entre estas, destacam-se o TNF- α e a interleucina -10 (IL-10).

A IL-10 caracteriza-se por potente propriedade anti-inflamatória, inibindo a produção de várias citocinas pró-inflamatórias, incluindo o TNF- α (BOLGER et al., 2002). Além disso, pode agir como um antagonista natural do TNF- α , através da

inibição da sinalização do fator nuclear kappa beta (NF- κ b), preservando o fator inibitório kappa beta (Ik-b) (SCHOTTELIUS et al., 1999).

Diversas doenças crônicas degenerativas, tais como obesidade, infarto do miocárdio e a caquexia associada ao câncer têm sido atualmente caracterizadas pela instalação de um quadro inflamatório crônico, com consequente aumento nas concentrações plasmáticas de citocinas pró-inflamatórias, além da proteína C reativa (PEDERSEN, 2007). Esses quadros vêm recebendo bastante atenção no que diz respeito a estratégias e terapias no tratamento da doença. Porém, até o presente momento, nenhuma terapia foi capaz de restaurar e/ou prevenir a instalação da síndrome em animais e pacientes com câncer (BOSSOLA et al., 2007).

Entre as diferentes estratégias sugeridas, destaca-se o treinamento aeróbico, sendo recomendado tanto na prevenção, como na restauração das alterações crônicas encontradas nos diversos tipos de doenças mencionados (BACURAU et al., 2001; COSTA ROSA, 2004; PETERSEN e PEDERSEN, 2005; BATISTA et al., 2007; BATISTA et al., 2008; LIRA et al., 2008). No entanto, poucos estudos têm buscado uma melhor compreensão sobre a relação tecido adiposo e exercício, que já foi descrito como importante fonte de citocinas inflamatórias nestes quadros patológicos (PEDERSEN, 2007).

Diante da importância das citocinas na regulação do quadro inflamatório e do papel do tecido adiposo como importante fornecedor desses fatores, foi interesse do presente estudo verificar o balanço de citocinas pró e anti-inflamatórias, no tecido adiposo de animais caquéticos. O possível efeito da aplicação do protocolo de treinamento aeróbico moderado sobre as alterações mediadas pela caquexia referente à produção dessas citocinas específicas foi também examinado.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Caquexia, citocinas e ativação da via inflamatória

A caquexia é a principal síndrome paraneoplásica. Ela afeta pelos menos a metade de todos os pacientes com câncer e a grande maioria (80%) dos pacientes com câncer avançado (ARGILES e LOPEZ-SORIANO, 1999). De forma simplificada, podemos defini-la como: “uma síndrome catabólica envolvendo a perda de músculo e gordura, causada diretamente por fatores tumorais, ou indiretamente pela resposta aberrante do hospedeiro à presença do tumor (SEELAENDER et al., 1996). Trata-se de um fenômeno clínico clássico, que evoca a imagem histórica de leitos hospitalares com pacientes sendo progressivamente “consumidos”. Constitui-se em uma síndrome multifacetada, de etiologia extremamente complexa, diretamente relacionada à redução da sobrevida e à prognose adversa (KAZANTZIS e SEELANDER, 2005).

A síndrome da caquexia associada ao câncer é caracterizada pela diminuição na ingestão alimentar (anorexia), diminuição no peso corporal e distúrbios metabólicos.

As complicações associadas ao agravamento da caquexia estão intimamente ligadas ao balanço de fatores anti e pró-caquéticos (ARGILES e LOPEZ-SORIANO, 1999). Dentre estes, destacam-se as citocinas fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e a interleucina 10 (IL-10).

As citocinas são pequenos polipeptídeos, que foram originalmente descobertos como de papel imunoregulatório. Várias dessas citocinas facilitam o influxo de linfócitos, neutrófilos, monócitos e outras células para focos de inflamação tecidual e/ou sistêmica (PETERSEN e PEDERSEN, 2005). A resposta de inflamação local é acompanhada por uma resposta sistêmica, que é conhecida como resposta de fase aguda. Esta resposta inclui a produção de inúmeras proteínas de fase aguda derivadas do fígado, tais como proteína C-reativa (PCR) e pode ser minimizada por injeções locais de citocinas, como TNF- α , IL-1 β e IL-6, em animais de laboratório ou humanos (PETERSEN e PEDERSEN, 2005). As citocinas, em especial TNF- α , IL-6 e IL-1 β são as mais estudadas, e diversas terapias são realizadas na tentativa de bloquear suas ações, porém todas falham ao tentar restaurar os danos causados pela caquexia (ARGILES et al., 2003).

O TNF- α foi descrito em 1975 e inicialmente foi nomeado como caquexina, graças a seu potente efeito citotóxico contra células tumorais. É um polipeptídeo trimérico (17 kDa), produzido principalmente por monócitos e macrófagos ativados, além de outras células, como linfócitos, fibroblastos, neutrófilos, músculo liso e mastócitos. Esta citocina pode atuar sobre quase todos os tipos de células nucleadas, através de dois tipos de receptores de membrana, o tipo I (RTNF-I, p55) e o tipo II (RTNF-II, p75) ou ainda, como molécula solúvel, todas formas biologicamente ativas. O aumento da transcrição gênica do TNF- α é mediado pela via do NF- κ B.

O fator de transcrição nuclear kappa (κ) B (do inglês nuclear factor κ B, NF- κ B) foi descrito em 1986 por Sen e Baltimore. É um fator nuclear (NF) que, uma vez ativado por agentes como lipopolissacarídeos (LPS), possui a capacidade de ligar-se a uma sequência de 10 pares de bases na região promotora do gene que codifica a cadeia leve κ das moléculas de anticorpo das células B (kB). A “família” NF- κ B é composta de 5 proteínas, que incluem p65, p50, p52, RelB e c-Rel. A dimerização de duas dessas proteínas é necessária para ativação da interação proteína-DNA. Além disso, NF- κ B p65 contém um domínio pós-transcricional terminal-COOH que é crucial para sua capacidade de ativação da expressão dos genes inflamatórios (YAMAMOTO e GAYNOR, 2004).

Quando não estimulado, o fator NF- κ B encontra-se no citoplasma ligado a uma proteína inibitória: o I κ B. Esse complexo impede a translocação do NF- κ B para o núcleo. Assim, a fosforilação e a degradação do I κ B são necessárias para que ocorra a translocação do NF- κ B para o núcleo (GLEZER, 2003).

A ação do TNF- α pode ser anulada ou minimizada por diferentes fatores. Dentre eles destaca-se a interleucina 10 (IL-10). A interleucina 10 (IL-10) é um polipeptídeo homodimérico de 17 kDa, que foi inicialmente descrito como um fator produzido por linfócito T auxiliares (tipo 2), com propriedades inibitórias em clones de linfócito T auxiliares (tipo 1), notadamente na resposta proliferativa e produção de citocinas (FIORENTINO et al., 1989). Esta citocina é produzida por uma série de diferentes tipos celulares, em especial por células inflamatórias como macrófagos e linfócitos T, para as quais é o principal inibidor da síntese de citocinas e da atividade funcional de macrófagos. Além disso, ela também exibe a importante característica de inibir a produção tanto das citocinas pró-inflamatórias como das metaloproteases da matriz, a quais têm sido descritas

como importantes moduladoras em algumas doenças (ANKER e COAST, 1999). Sua atividade biológica é mediada através de seu receptor de membrana (IL-10R), o qual pertence ao subgrupo de receptores similares ao interferon (INF), da família dos receptores de citocinas classe II (MALEFYT, 1999).

Funcionalmente, a ação da IL-10 sobre seu receptor (IL-10R1) reflete sua ação pela ativação da via JAK-STAT (Janus Kinases - Signal Transducers and Activators of Transcription), especificamente sobre a JAK1 e STAT3 em macrófagos, e essa ativação é dependente da SOCS3 (Suppressor of Cytokine Signaling-3) (RILEY et al., 1999; MURRAY, 2007).

Dessa forma, a IL-10 pode inibir a produção de várias citocinas, tais como: TNF- α , IL-1 β e IL-6, em uma variedade de tipos celulares, além de se auto-modular (MALEFYT et al., 1999; MOORE et al., 1993). Além disso, a IL10 também aumenta a liberação dos receptores TNFR, os quais podem antagonizar os efeitos do TNF- α (FERRARI et al., 1995; NOZAKI et al., 1998). Corroborando estas informações supra-citadas, diversos estudos têm demonstrado que a IL-10 tem produção aumentada em processos inflamatórios, exercendo uma função predominantemente imunomoduladora nessas condições (KATSIKIS et al., 1994; DAFTARIAN et al., 1996; ESPOSITO et al., 2003; JUNG et al., 2007; BATISTA, 2007). Essa linha de raciocínio sugere que a IL-10 atuaria como um mecanismo de retroalimentação negativa, contrabalançando o excesso de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α . A este exemplo, Bolger et al. (2003) demonstraram que a IL-10 inibe a secreção de TNF- α em células mononucleares isoladas do sangue periférico (*ex vivo*) de pacientes com infarto do miocárdio.

2.2 Tecido adiposo e caquexia associada ao câncer

Apesar de estudos recentes apontarem que a diminuição da massa muscular esquelética seja provavelmente o fator regulatório mais importante da sobrevivência na caquexia associada ao câncer (por exercer funções primordiais, ex: função muscular respiratória) (TISDALE, 2005), muito se especula sobre a importância do tecido adiposo também na caquexia, pois ele pode colaborar para o agravamento da mesma. Estudos recentes suportam a idéia de que exista uma via de comunicação entre o tecido adiposo e o músculo esquelético (QUIN et al., 2005). Importaneamente, os dois tecidos são capazes de

secretar citocinas pró-inflamatórias e estas citocinas são capazes de atuar em diversos outros tecidos (FIGUERAS et al., 2005). Assim, o tecido adiposo possui, tanto quanto o músculo esquelético, participação na inflamação local e/ou sistêmica, observado na caquexia.

Classicamente, o tecido adiposo é considerado predominantemente um reservatório energético, disponibilizando ácidos graxos não esterificados quando os nutrientes exógenos são insuficientes para suprir as necessidades energéticas (TOMAS et al., 2004). Entretanto, após a descoberta de que o tecido adiposo é capaz de secretar proteínas denominadas “adipocinas”, com importantes efeitos biológicos, o mesmo passou a ser considerado um órgão endócrino (FONSECA-ALANIZ et al., 2006). As chamadas adipocinas possuem estrutura e funções fisiológicas variadas e assemelham-se com proteínas relacionadas ao sistema imune, destacando-se entre elas citocinas pró-inflamatórias, tais como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina 6 (IL-6), interleucina 1 beta (IL-1 β), interleucina 8 (IL-8), receptor antagonista da interleucina 1 (IL-1ra), Leptina, adiponectina, haptoglobina, proteína quimioatraente de monócito 1 (MCP-1) e fatores de crescimento (fator transformador de crescimento beta – TGF- β) (FONSECA-ALANIZ et al., 2006).

Um aspecto elegantemente destacado no estudo de Skurk et al (2007) foi que a expressão gênica e protéica nos adipócitos está intimamente relacionado com seu tamanho e área. Curiosamente, os autores supracitados observaram que esta relação é verdadeira para todas as citocinas pró-inflamatórias estudadas (TNF- α , IL-6, IL-8, MCP-1) e para IL-1ra, adiponectina, porém a IL-10, contudo, mostrou tendência à expressão gênica e protéica diminuída conforme há aumento do tamanho do adipócito.

Classicamente, a obesidade está relacionada ao aumento exarcebado da massa dos depósitos de gordura e aumento na expressão gênica e protéica de citocinas pró-inflamatórias (TRAYHURN e WOOD, 2004). Inversamente ao quadro da obesidade, o tecido adiposo de animais e pacientes caquéticos encontra-se com sua massa reduzida. Porém, neste caso, o que se observa é um exacerbado aumento na expressão gênica e protéica de citocinas pró-inflamatórias, além de infiltração de macrófagos, similarmente a animais e indivíduos obesos (MACHADO et al., 2004; FIGUERAS et al., 2005). Em vista disso, o tecido adiposo tanto em situação de maior acúmulo (obesidade) quanto em situações que encontra-se com seus depósitos depletados (caquexia) mostra resposta

semelhante. Esta resposta inflamatória pode ser potencializada pelos macrófagos infiltrados neste tecido, os quais executam alta capacidade em produzir citocinas (MACHADO et al., 2004; BRUNN et al., 2006), presente em associação aos dois quadros patológicos mencionados.

Estudos conduzidos por Bing et al (2006) demonstraram que camundongos que portavam o tumor MAC-16, apresentavam perda de peso corporal e diminuição na ingestão alimentar (características típicas da caquexia). Estes animais apresentaram alterações na expressão gênica de proteínas chaves da adipogênese. Interessantemente, os autores observaram um remodelamento na estrutura dos adipócitos, aumento de fibras colágenas e no número de mitocôndrias, acompanhado pelo aumento na expressão gênica do PGC-1 α , um fator transcricional envolvido na via de utilização dos ácidos graxos. Apesar de outros estudos mostrarem em outros modelos animais e outros tipos de tumores que o tecido adiposo de ratos portadores de tumor apresenta infiltração de macrófagos, o tumor MAC-16 não induz essa resposta.

2.3 Treinamento aeróbio e citocinas anti e pro-inflamatórias

Durante o exercício de intensidade moderada de duração, o músculo esquelético aumenta sua capacidade de produção de IL-6 em até 100 vezes. A IL-6 é conhecida hoje como a primeira miocina (citocina secretada pelo músculo esquelético) (STEENBERG et al., 2000). O efeito anti-inflamatório induzido pelo exercício provém do aumento primeiramente da IL-6, e em seguida, do aumento da IL-1ra e da IL-10. Temos que ressaltar que a IL-6 é considerada uma citocina imunomodulatória (PEDERSEN e FISCHER, 2007).

O efeito anti-inflamatório da IL-6 é também demonstrado pelo fato dela estimular a produção da IL-1ra e da IL-10 (STEENBERG et al., 2003). Ainda, a IL-6 estimula a liberação do receptor solúvel do TNF- α (TILG et al., 1997). O aparecimento da IL-10 e da IL-1ra na circulação após exercício também contribui para o efeito anti-inflamatório induzido pelo mesmo (PETERSEN e PEDERSEN, 2005).

O efeito crônico do exercício (treinamento) sobre a produção de citocinas pró-inflamatórias tem sido recentemente estudado (CHEN et al., 2007; SLOAN et al., 2007). Estudos conduzidos por Chen e colegas (2007), demonstraram que ratos treinados por 4

semanas em intensidade moderada, quando submetidos à infusão de LPS por 20 minutos, tiveram à capacidade de produção de TNF- α e IL-1 β diminuída nas células sanguíneas (monócitos, neutrófilos) em relação ao grupo sedentário. Resultados semelhantes foram encontrados no estudo de Sloan e colegas (2007), no qual sujeitos sedentários foram submetidos a um programa de treinamento por 12 semanas, em duas intensidades (moderada, 60% da frequência cardíaca máxima e alta, 75% e 80% da frequência cardíaca máxima). Quando células sanguíneas (monócitos) foram estimuladas com LPS (antes e após treinamento) a capacidade de produção do TNF- α no grupo treinado em alta intensidade foi reduzida em relação a pré-treinamento. Já o grupo que treinou em intensidade moderada não apresentou diferença. Ambos os trabalhos supracitados atribuem essa menor produção de TNF- α pelas células sanguíneas aos dos efeitos anti-inflamatórios induzidos pelo treinamento.

O tecido adiposo mesentérico de ratos submetidos ao protocolo de treinamento aeróbico crônico (8 semanas, 5 vezes por semana, 60% do VO_{2max}), apresentou aumento na concentração de TNF- α , e um aumento ainda superior da IL-10, quando comparados ao grupo sedentário (LIRA et al., 2008b). Acreditamos que atribuem o aumento do TNF- α relaciona-se a um possível papel modulador sobre o metabolismo lipídico, proporcionando lipólise em tecidos adjacentes. O aumento ainda mais exarcebado da concentração da IL-10, ocorreria, por sua vez, para bloquear os possíveis efeitos deletérios causados pelo TNF- α . Este raciocínio fica mais evidente quando apresentamos a taxa IL-10/TNF- α , aumentada no grupo treinado em relação ao grupo sedentário.

Gomez-Merino e colegas (2007), após submeterem animais ao protocolo de treinamento intenso por 7 semanas, observaram aumento na concentração de IL-1 α , IL-1 β e IL-12 no tecido adiposo em relação ao grupo sedentário. As concentrações de TNF- α e IL-10 não apresentaram diferenças. Temos que ressaltar que a intensidade, volume e a duração da aplicação do protocolo de treinamento são variáveis determinantes na modulação das citocinas (PETERSEN e PEDERSEN, 2005).

O termo “exercício como estratégia complementar ao tratamento de doenças crônicas”, foi título da revisão do Professor Costa Rosa (2004). Sua abordagem é direcionada para o eixo neuroimunoendócrino, o qual se encontra alterado em algumas doenças, entre essas a caquexia associada ao câncer (MARTINS et al., 1998), e a aplicação

do programa de exercícios físicos seria eficiente em restaurá-los. Dados publicados por seu grupo reforçam esta idéia (BACURAU et al., 2000; BATISTA et al., 2007a; BATISTA, 2007b; BATISTA et al., 2008).

Tomados em conjunto, esses estudos sugerem um papel de suma importância da IL-10 em doenças inflamatórias crônicas, principalmente devido ao seu efeito modulador da síntese e secreção do TNF- α e desta forma, essa citocina vem ganhando um papel de destaque como possibilidade terapêutica.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Com vista em todas as alterações encontradas no tecido adiposo branco de ratos caquéticos portadores de tumor, principalmente no que tange as citocinas pro (TNF- α e IL-1 β) e anti-inflamatórias (IL-10), decidimos investigar os possíveis efeitos desta síndrome sobre a expressão gênica e o conteúdo destas proteínas no tecido adiposo mesentérico e retroperitoneal. Verificamos ainda o efeito da aplicação do protocolo de treinamento aeróbio sobre tais parâmetros em animais portadores do tumor.

3.2 Específico

Investigar o efeito da caquexia associada ao câncer sobre a expressão e conteúdo de citocinas pro (TNF- α e IL-1 β) e anti-inflamatórias (IL-10) no tecido adiposo branco, verificando a heterogeneidade do mesmo em resposta a síndrome.

Investigar o efeito do protocolo de treinamento físico, sobre as alterações promovidas pela caquexia na expressão gênica e o conteúdo de citocinas pró (TNF- α e IL-1 β) e anti-inflamatórias (IL-10) no tecido adiposo branco, considerando a heterogeneidade do mesmo em resposta ao protocolo de treinamento.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Reagentes

Sais em geral, peróxido de hidrogênio, álcool etílico absoluto, álcool metílico, álcool isopropílico, éter etílico, clorofórmico, ácido acético glacial e xilol, foram obtidos da Merk (Alemanha) e Mallinckrodt (México). Tween 20, NaOH e KOH foram provenientes da Labsynth (Diadema, SP, Brasil), brometo de etídio e bromofenol azul da BioRad Laboratórios (Hercules, CA, USA). Randon primers, agarose, tampão RT, enzimas RT, tampão DNase, DNase I, Taq polimerase e cloreto de magnésio e dietiotreitól (DTT) foram adquiridos da Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) e os *primers* dos genes estudados da Prodimol Biotecnologia S/A (Integrated DNA Technologies, Inc.).

4.2 Animais

Os procedimentos experimentais estão de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido o protocolo para o uso de animais em experimentação (041/2005) aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEa).

Foram utilizados ratos *Wistar* machos, com peso inicial de 150-200g, idade entre 6 a 8 semanas. Durante o período experimental foram mantidos em gaiolas coletivas para 5 ratos em biotério com ciclo claro/escuro de 12/12 horas, com início do período claro às 7 horas, do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento no Instituto de Ciências Biomédicas - USP. A temperatura ambiente da sala foi mantida em $25 \pm 2^\circ\text{C}$. A umidade do ar foi mantida em $60 \pm 5\%$. Para todos os grupos foi oferecida ração comercial balanceada (NUVILAB® CR1 - Nutrivital Nutrientes Ltda.) e água *ad libitum*.

A fim de minimizar a influência aguda do *status* prandial nos resultados experimentais, todos os animais foram submetidos a jejum durante a noite anterior à manhã do sacrifício. Os animais foram sacrificados por decapitação sem anestesia, após 24 horas da última sessão de treinamento aeróbio.

4.3 Ingestão alimentar

A ingestão alimentar dos seis grupos foi monitorada durante todo o período da progressão tumoral (14 dias).

4.4 Desenho experimental

4.4.1 Descrição dos grupos experimentais:

Primeiramente os animais foram divididos em dois grupos: Sedentários (S) e Treinados (T). Após seis (6) semanas de treinamento aeróbio em esteira rolante, os animais foram divididos em seis (6) grupos: Sedentário Controle (SC); Sedentário Tumor (ST), Sedentário Pair-Fed (SPF), Treinado Controle (TC), Treinado Tumor (TT) e Treinado Pair-Fed (TPF):

Sedentário Controle (SC) - Ratos adultos-jovens, que permaneceram em gaiolas sem nenhum tipo de manipulação, recebendo água e ração *ad libitum*.

Sedentário Tumor (ST) - Ratos adultos-jovens, nos quais injetou-se as células do tumor de Walker 256 subcutaneamente, na proporção de 2×10^7 células por rato em 1,0 ml, no flanco direito dos animais, conforme descrito por Seelaender et al (1998), recebendo água e ração *ad libitum*.

Sedentário Pair-Fed (SPF) - Ratos adultos-jovens, cuja alimentação foi pareada com grupo sedentário tumor. Trata-se de grupo controle, na intenção de isolar os eventuais efeitos da redução na ingestão alimentar promovida pela implantação do tumor Walker 256 (McCARTHY et al., 1993), recebendo água *ad libitum*.

Treinado Controle (TC) - Ratos adultos-jovens, submetidos ao protocolo de treinamento aeróbio moderado, recebendo água e ração *ad libitum*.

Treinado Tumor (TT) - Ratos adultos-jovens, submetidos ao protocolo de treinamento aeróbio moderado, e que, no início da sétima (7) semana de treinamento, receberam as células do tumor de Walker 256 subcutaneamente, na proporção de 2×10^7 células por rato em 1,0 ml, no flanco direito dos animais, conforme descrito por Seelaender et al (1998), recebendo água e ração *ad libitum*.

Treinado Pair-Fed (TPF) - Ratos adultos-jovens, submetidos ao protocolo de treinamento aeróbio moderado, que no início da sétima (7) semana de treinamento tiveram alimentação pareada com grupo treinado tumor, água *ad libitum*.

4.5 Protocolo de treinamento aeróbio moderado

O protocolo treinamento de corrida em esteira ergométrica para ratos foi desenvolvido a partir do protocolo descrito por Bacurau et al. (2000). Este foi realizado em sistema de esteira ergométrica para ratos (AVS projetos especiais).

Os animais foram divididos em 6 grupos. Três (3) desses grupos foram sedentários, portanto, não submetidos a nenhum tipo de treinamento. Todos animais foram sacrificados no mesmo dia que seus respectivos grupos controle, 24 horas após a última sessão de treinamento. Os três grupos de animais que treinaram em intensidade moderada (60% VO_{2max}) foram exercitados diariamente em esteira rolante, como esquema abaixo:

Tabela 1 Protocolo de treinamento semanal para ratos em esteira ergométrica.

	2º feira	3º feira	4º feira	5º feira	6º feira		intensidade
Adaptação	15min.	15min. 10m/	15min.	20min.	30min.		
2 semanas	10m/m	m	15m/m	15m/m	15m/m		
3º semana	30 min.	35 min. 5m/	40 min.	50 min.	60 min.		60% VO_{2max}
	5m/m	m	5m/m	5m/m	5m/m		
4º semana	30 min. 10m/	35 min. 10m/	40 min.	50 min. 10m/	60 min. 10m/		60% VO_{2max}
	m	m	10m/m	m	m		
5º semana	30 min. 13m/	35 min. 13m/	40 min.	50 min. 13m/	60 min. 13m/		60% VO_{2max}
	m	m	13m/m	m	m		
6º semana	30 min. 15m/	35 min. 15m/	40 min.	50 min. 15m/	60 min. 15m/		60% VO_{2max}
	m	m	15m/m	m	m		
7º semana	30 min. 18m/	35 min. 18m/	40 min.	50 min. 18m/	60 min. 18m/	Inoculação do tumor no início da semana	60% VO_{2max}
	m	m	18m/m	m	m		
8º semana	30 min. 20m/	35 min. 20m/	40 min.	50 min. 20m/	60 min. 20m/	Sacrifício (24h após última sessão de treinamento)	60% VO_{2max}
	m	m	20m/m	m	m		

4.6 Obtenção das amostras

4.6.1 Procedimentos gerais

Para reduzir a presença das ribonucleases (RNAses) foram adotados os seguintes procedimentos: utilização de material descartável; esterilização da vidraria (em forno, a 250 °C, por 4 minutos); manipulação de amostras e materiais com luvas; utilização de água tratada com dietil-piromcarbonato (Sigma-DEPC 0,01% vol/vol, sob agitação magnética, por 12 horas, autoclavada).

4.7 Obtenção e homogeneização dos tecidos

Imediatamente após o sacrifício, os tecidos (Tecido Adiposo Retroperitoneal (TARP) e Tecido Adiposo Mesentérico (TAME) foram removidos, pesados, congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80 °C, para dosagens posteriores.

Durante o processo de homogeneização, o TARP e o TAME foram descongelados em gelo, diluídos em 1:10 em tampão de lise celular (The Cell Lysis Kit, nº 171-304012, Bio-rad; Hercules, CA, USA), contendo um cocktail com inibidores de proteases. As amostras foram processadas em duas etapas. Na primeira, os tecidos foram rompidos através suspensão e ressuspensão em pipeta com *tip* de 1 mL por 20 vezes, seguido por agitação orbital durante 20 minutos a 300 rpm a 4°C. Na segunda etapa, os tecidos foram homogeneizados em desmembrador ultrasônico (modelo 100, Fischer Scientific, Pittsburg, USA) a 4°C em três pulsos rápidos (< 1 seg. cada). Findo os dois procedimentos de homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 15000 x g, durante 20 minutos a 4°C e o sobrenadante coletado armazenado a -80 °C para dosagens posteriores.

4.8 Obtenção do plasma

Após o sacrifício dos animais o sangue total foi coletado e armazenado em tubos plásticos (tubos Falcon 15 mL, esterilizados) para a extração do soro, que se deu após a centrifugação (500 x g) durante 15 minutos à temperatura de 12 °C. Após o final da

centrifugação o soro foi aliquotado em tubos do tipo *eppendorf* (2 mL) e armazenado em *freezer* -80 °C para dosagens posteriores.

4.9 Quantificação das citocinas teciduais

4.9.1 Determinação da concentração de proteínas totais do homogeneizado

A quantificação das proteínas totais nos tecidos avaliados foi determinada através do kit *Protein Assay-Bradford Method Biotechnology Grade* (E535, AMRESCO, Inc. USA). Este procedimento foi baseado no método colorimétrico descrito por Bradford et al. (1976), o qual utiliza o corante *Coomassie Brilliant Blue G-250*, que induz alteração de cor após a ligação com as proteínas desconhecidas, através da formação de um complexo que pode ser detectado por espectrofotometria de luz em comprimento de onda a 595 nm. Os valores da proteína desconhecida foram então comparados com a curva padrão de albumina (0,05 – 0,5 µg / µL).

As amostras (diluídas em 100 vezes) e os pontos da curva foram plaqueados em triplicatas, com 10 µL por poço. Após este procedimento, acrescentou-se 190 µL de *Coomassie Brilliant Blue G-250*, diluído em 10 vezes. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Hitachi) a 595 nm. Os dados de absorbância (eixo x) foram plotados junto aos valores referentes às diferentes concentrações da curva-padrão (eixo y), e após a elaboração da curva da reta (regressão linear), os valores foram expressos em µg / µL de proteína tecidual .

4.9.2 Enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA)

Para dosagem das citocinas TNF-α (DY510), IL-1β (DY501) e IL-10 (DY522) foi utilizado o método *enzyme-linked immunoabsorbent assay* (DuoSet ELISA) de captura (R&D System, Inc., Minneapolis, USA). Este ensaio foi realizado em amostras homogeneizadas de acordo com o itens (4.7), proveniente dos diferentes grupos experimentais. Placas com 96 poços foram sensibilizadas com 100 µL de anticorpo monoclonal anti-rato IL-10, IL-1β e ou TNF-α (anticorpo de captura) e incubadas

overnight em temperatura ambiente. Após este período, os poços foram lavados por 3 vezes com tampão para lavagem (0,05% Tween® 20 em PBS, pH 7,2 – 7,4). Posteriormente, a placa foi bloqueada para evitar ligações inespecíficas com 300 µL de solução de bloqueio (1% BSA em PBS, pH 7,2 – 7,4, 0,2 µm filtrado) e incubada por 1 hora em temperatura ambiente. Findo este prazo, os poços foram lavados novamente como descrito acima.

Após o bloqueio, foram adicionados 100 µL por poço das amostras e dos padrões diluídos previamente em reagente de diluição (1% BSA em PBS, pH 7,2 – 7,4, 0,2 µm filtrado), e cobertos com fita adesiva. Em dois poços foram colocados somente o reagente de diluição para caracterização do branco. A placa foi incubada por 2 horas em temperatura ambiente. Após este período, os poços foram lavados por 3 vezes com tampão de lavagem (0,05% Tween® 20 em PBS, pH 7,2 – 7,4).

Após as lavagens, adicionou-se 100 µL do anticorpo de detecção (Anticorpo anti-rato IL-10, IL-1β e ou TNF-α Biotinilado) diluídos previamente em reagente de diluição (1% BSA em PBS, pH 7,2 – 7,4, 0,2 µm filtrado) na concentração estabelecida, cobertos com fita adesiva e incubado por 2 horas em temperatura ambiente. Os poços foram lavados novamente como descrito acima. Posteriormente, adicionou-se 100 µL de Streptoavidina-HRP (1:250) por poço, que foram cobertos com papel laminado e incubados por 30 minutos, à temperatura ambiente. Findo este prazo, os poços foram lavados novamente como descrito acima. Posteriormente, a solução de substrato (mistura dos reagentes de cores A - H₂O₂ e B - Tetrametilbenzidina) foi adicionado na diluição de 1:1 por poço, seguido de incubação por 30 minutos à temperatura ambiente, evitando-se contato direto da placa com a luz. A reação foi interrompida com 50 µL de H₂SO₄ 30% por poço sob agitação lenta. A leitura foi feita em leitor de ELISA (Power Wave, Bio-tek), utilizando-se filtro de 450 nm.

4.10 Quantificação da expressão dos genes das citocinas teciduais

4.10.1 Extração de RNA

Para isolar o RNA total do tecido adiposo retroperitoneal e mesentérico, as amostras pesando entre 0,2 e 0,5 g foram homogeneizadas em TRIzol® Reagent. A partir desta etapa,

seguiu-se o protocolo de extração de RNA, conforme as instruções do fabricante. O RNA total extraído foi tratado com 10 U de deoxiribonuclease ribonuclease (RNase)-free por 1 hora a 37°C. Após o tratamento, foi realizada uma extração com igual volume de mistura contendo fenol-clorofórmio-álcool isoamílico na proporção de 25:24:1, seguida por precipitação com 0,2 M de acetato de sódio e 2 volumes de etanol absoluto. O RNA precipitado foi lavado com etanol 70% para eliminar resíduos de fenol e sal, e solubilizado em água tratada com DEPC.

Para a quantificação do RNA foram feitas alíquotas equivalentes a 2 µg acrescidas de água para totalizar a diluição de 1:150. A concentração das amostras de RNA total foi determinada por espectrofotometria no comprimento de onda de 260 nm (correspondente ao pico de absorção de RNA) e 280 nm (correspondente ao pico de absorção de proteínas). A integridade das amostras foi verificada através de eletroforese em gel de agarose 1%, contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídeo. O gel foi imerso em tampão TBE 1X e a eletroforese realizada a 100 Volts por aproximadamente 45 minutos. O TRIzol® Reagent, uma solução monofásica de fenol e guanidina isotilcianato corresponde a uma variação do método desenvolvido por Chomczynski e Sacchi (1987).

4.10.2 Transcrição Reversa (RT)

As amostras de RNA foram transcritas para DNA em um termociclador (Techne, Cambridge, UK). Para a síntese do cDNA foram utilizados 2 µg de RNA total de cada amostra. As amostras foram incubadas com 0,5 µg/mL de oligo dT12-18 (Invitrogen, USA) a 65°C por 5 minutos, para se obter a primeira fita de cDNA. A transcrição reversa das amostras foi realizada em um volume total de 20 µL contendo 10 mM de dNTPs, 0,1 M de DTT, 1X tampão da enzima, 3U de RNAsin e 2,5U de transcriptase reversa (M-MLV-RT). Após incubação por 1 hora a 37°C, a temperatura foi elevada a 95°C por 5 minutos e as amostras rapidamente colocadas em gelo para denaturação de híbridos RNA-cDNA formados e inativação da enzima utilizada na reação. Em alguns tubos, a transcriptase reversa não foi adicionada, a fim de se controlar a contaminação ou amplificação de DNA genômico. O cDNA obtido foi estocado a -20°C até que fosse realizada a reação de PCR.

4.10.3 Seleção dos *primers*

Os *primers* foram sintetizados pela *Integrated DNA Technologies* (Prodímol Biotecnologia S/A). A sequência foi determinada usando o *software Primer 3*, disponível on-line no sítio <http://www.genome.wi.mit.edu>, selecionados sempre de acordo com os seguintes parâmetros; comprimento entre 18 e 24 pares de base (bp), com comprimento ótimo de 20-22 bases, T_m entre 58 e 62°C, com temperatura ótima de 60°C e comprimento do produto amplificado entre 200 a 400 bp. O conteúdo de C + G foi entre 40 a 60%, com conteúdo ótimo acima de 50%, e neste caso, seqüências e bases repetidas (> 3 bases idênticas) foram evitadas. Para determinar a especificidades, todas as seqüências foram comparadas com o *Genbank* usando o programa Blast disponível no sítio da *National center for Biotechnology Information* (www.ncbi.nlm.gov). Quando ambas as seqüências dos *primers* demonstraram homologia para o mesmo gene, diferente daquele de interesse, esta foi descartada. Todos os *primers* selecionados para o PCR foram configurados de maneira que o produto amplificado fosse sintetizado em exons diferentes, evitando desta forma a contaminação do DNA genômico.

Tabela 2 Sequência dos *primers* do RT-PCR.

Genes	Primer sense	Primer antisense	Tamanho (bp)	Genbank
TNF-α	5'TCTCAAAACTCG AGTGACAAGC3'	5'GGTTGTCTTTGAG ATCCATGC3'	220	NM 012675.2 GI:82524821
IL-10	5'GACCCATGAGAG TCTTCACAAC3'	5'GATCTTAGCTAAC GGGAGCAAC3'	220	NM 012854.1 GI:7549766
IL-1β	5'GAGTCACAGAAG GAGTGGCTAA3'	5'ACAGTGAGGAAT GTCCACAAAC3'	253	NM 012589.1 GI:7549768
PPAR-γ	5'GATCCTCCTGTTG ACCCAGA3'	5'TCAAAGGAATGG GAGTGGTC3'	200	NM 199267.2 GI:51036682
RPL-19	5'AGGCTACAGAAG AGGCTTGC3'	5'CCATGAGAATCCG CTTGTTT3'	423	NM 213557.1 GI:47087102

4.10.4 Reações de PCR (semí quantitativo)

PCR do cDNA: O cDNA foi amplificado utilizando-se 0,5 µl da enzima Taq DNA polimerase (2,5U), MgCl (1,25 mM), dNTPs Mix (0,2mM), e oligosondas específicas para TNF- α , IL-10, IL-1 β , PPAR- γ e RPL-19 de tecido adiposo de ratos, baseado nas sequências descritas anteriormente. A amplificação do cDNA foi eficiente em 37 ciclos para TNF- α , 38 ciclos para IL-10, 37 ciclos para IL-1 β , 34 ciclos para PPAR- γ por 45 s a 94°C, 60 s a 60°C (TNF- α), 58°C (IL-10), 60°C (IL-1 β) e 54°C (PPAR- γ) e 60s a 72°C para todos. O gene da RPL-19 foi usado como controle interno. O produto obtido pela amplificação do PCR foi verificada através de eletroforese em gel de agarose 1,2%, contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídeo. O gel foi imerso em tampão TBE 0,5X e a eletroforese realizada a 100 Volts por aproximadamente 45 minutos. A visualização da imagem foi realizada em aparelho Typhoon (*Molecular Dynamics*).

Análise dos Resultados: As imagens obtidas foram quantificadas pelo programa Image QuANT TM(*Molecular Dynamics*). Para cada amostra foi calculada a relação gene/RPL19.

4.11 Parâmetros plasmáticos

4.11.1 Radioimunoensaio (RIE) para corticosterona

Para a determinação quantitativa do hormônio sérico corticosterona (DSL-80100) foi utilizado através do kit radioimunoensaio (RIE) de competição entre um antígeno radioativo e outro não radioativo por um número fixo de sítios de ligação no anticorpo (Genese, Diagnostic System Incorporation, Inc., USA).

Este ensaio foi realizado com alíquotas de soro proveniente dos diferentes grupos experimentais. Antes da dosagem, as amostras foram descongeladas em banho de gelo e mantidas a 4 °C ou menos. Foram incubados 25 µL de plasma, padrões e 500 µL do Reagente Corticosterona de rato (I-125) em cada tubo, mais 125 µL do padrão A (0 ng/mL) para o NSB (ligação não específica). Por último, foram adicionados 100 µL de anti-soro

corticosterona de rato, agitando-se suavemente as amostras por 1 minuto, por uma (1) hora, a 37°C (exceto o tubo NSB). Findo este prazo, foi adicionado 1 mL de reagente Precipitante, agitado imediatamente e incubado por 15 minutos em temperatura ambiente. Todos os tubos foram centrifugados (exceto o tubo NSB) por 15 minutos a 1500 x g.

Os tubos foram decantados por inversão simultânea com o suporte de espuma, em recipiente para descarte de radioativo, com auxílio de papel absorvente, durante 2 minutos e contados em contador gama por 1 minuto. Os resultados foram calculados utilizando os dados de log (eixo-x) vs. linear (eixo-y) e ajuste da curva com interpolação linear. A sensibilidade de detecção do método foi de 2,7 ng/mL (Padrão 0 pg/mL).

4.11.2 Radioimunoensaio (RIE) para Leptina

Para a determinação quantitativa do hormônio sérico Leptina (RL-83K - rat) foi utilizado através do kit radioimunoensaio (RIE) de competição entre um antígeno radioativo e outro não radioativo por um número fixo de sítios de ligação no anticorpo (Genese, Diagnostic System Incorporation, Inc., USA).

Este ensaio foi realizado com alíquotas de soro proveniente dos diferentes grupos experimentais. Antes da dosagem, as amostras foram descongeladas em banho de gelo e mantidas a 4 °C ou menos. Foram incubados 200 µL de soro, padrões, e mais 300µL do padrão A (0 ng/mL) para o NSB (ligação não específica). Por último, foram adicionados 100 µL de anti-soro Leptina de rato, agitado suavemente durante 1 minuto, por 4 horas a 37°C (exceto o tubo NSB). Após este período, foi adicionado 100 µL de reagente precipitante em todos os tubos (exceto o tubo NSB) e incubados *overnight* a 4°C. Adicionou-se 1 mL de reagente Precipitante, agitado imediatamente e incubando-se por 15 minutos à temperatura ambiente. Todos os tubos foram centrifugados (exceto o tubo NSB) por 15 minutos a 1500 x g.

Os tubos foram decantados por inversão simultânea com o suporte de espuma, em recipiente para descarte de radioativo, com auxílio de papel absorvente, durante 2 minutos e contados em contador gama por 1 minuto. Os resultados foram calculados utilizando os dados de log (eixo-x) vs. log (eixo-y) e a % B/T foi utilizado para determinar as

concentrações dos pontos da curva. A sensibilidade de detecção do método foi de 0,05 ng/mL (Padrão 0,01 ng/mL).

4.12 Imunolocalização de Macrófagos

4.12.1 Perfusão

Os animais dos diferentes grupos foram anestesiados com hidrato de cloral 10% (p/v) em solução salina (NaCl 0,9%), e a caixa torácica foi aberta com duas incisões através das costelas. Foram injetadas 150U de Lique mine no ventrículo esquerdo dos animais, para impedir a coagulação do sangue. Um cateter acoplado à bomba peristáltica Masterflex (Cole-Pamer, USA) foi inserido no ventrículo esquerdo e o átrio direito sofreu imediatamente um pequeno corte para escape da pressão excessiva criada pela infusão da solução através do cateter. Foi realizada uma lavagem prévia com solução salina, a 4°C, por 5 minutos e então infundida a solução fixadora de paraformaldeído 4% (p/v) em tampão fosfato, pH 7.4, a 4°C, que circulou em fragmentos cúbicos de aproximadamente 1cm³, que permaneceu imersos sob a solução fixadora por mais 4 horas a 4°C.

4.12.2 Obtenção e processamento do tecido

Os fragmentos foram lavados em água corrente por meia hora e submetidos ao processamento, durante o qual foram desidratados com concentração crescente de álcool; diafanizados com banhos de xilol, e incluídos em paraplast (Paraplast X-tra, SEM). Foram então emblocados em Tissue Cassetes (Fisher Scientific) e cortados em micrótomo rotatório (R Jung-Heidelberg). Os cortes de 5µm de espessura foram estendidos em lâminas previamente cobertas com polilisina (Sigma).

4.12.3 Desparafinização/Hidratação

Os cortes foram desparafinizados com sucessivos banhos de xilol (3 banhos de 1 hora, meia hora e 20 minutos, respectivamente), hidratados em concentrações decrescentes de álcool (2 x 100%, 1 x 95% e 1 x 70%) e lavados em água filtrada e destilada.

4.12.4 Reação de Imunohistoquímica

O bloqueio da peroxidase endógena foi feito com solução H_2O_2 20 volumes/metanol (1:1). O material foi lavado com água filtrada, água destilada e tampão fosfato 0,1M (pH 7,4). O bloqueio dos sítios antigênicos inespecíficos foi realizado com albumina 1% em tampão fosfato 0,1M/Triton 0,2% (1:10).

A incubação com anticorpo primário monoclonal Anti-RT1B de ratos (BD Pharmingen) foi feita na diluição de 1:50 em tampão fosfato 0,1M/Triton 0,2% por 16 horas à 4°C. Então, o material foi lavado em tampão fosfato 0,1M, e em seguida, foi feita a incubação do anticorpo secundário Horse anti-mouse biotinilado (Jackson ImmunoLabs) diluído 200 vezes em tampão fosfato 0,1M/Triton 0,2% por 2 horas à temperatura ambiente. O material foi lavado novamente em tampão, e incubado com o complexo terciário biotina-anidro peroxidase (Kit ABC/Elite Vectastain, Vector) por 2 horas à temperatura ambiente.

O material foi novamente lavado em tampão, e foi realizada a revelação com diaminobenzidina (DAB, Sigma). As lâminas foram montadas em glicerol carbonato e foram observadas em microscopia de luz Olympus BX 40. As imagens foram fotografadas com auxílio de uma câmara 3CCD (MTI) acoplada a um PowersMacintosh G3.

4.13 Contagem dos macrófagos infiltrados no tecido adiposo

O isolamento dos macrófagos infiltrados no tecido adiposo foi realizado conforme descrito por Machado et al (2004). Os diferentes depósitos de tecido adiposo foram lavados com solução fosfato livre de cálcio, e então fragmentados. E em seguida as amostras foram incubadas em meio contendo 5IU/ml de tripsina em banho maria (37°C), com agitação por 1 hora. As células mononucleadas foram contadas após aderência à superfície da placa de Petri (Nunc, USA). Os valores estão expressos em número de células $\times 10^5$.

4.14 Análise estatística

A análise dos dados foi realizada através do *software SigmaStat* (versão 3.1, SigmaStat, SYSTAT, Point Richmond, CA). A média aritmética e o erro padrão da média (EPM) foram calculados para todas as variáveis estudadas. A primeira observação indica que os resultados apresentam distribuição normal, após realização do teste de Kolmogorov-Smirnov e que não há diferença na variância entre as amostras dos grupos (heterocedasticidade), após realização do teste de igualdade de variância. Após a período experimental os valores das diferentes análises foram analisados pela Análise de variância (ANOVA) a 2 fatores em um desenho experimental de 2 x 2 (sedentário / treinado vs. controle / tumor). Com este tipo de análise, os fatores foram avaliados como Efeito Principal (efeito no grupo controle vs. grupo tumor; A, e efeito no grupo sedentário vs. grupo treinado; B) e como Efeito de Interação entre os fatores A e B, que consistiu em A x B. Quando o valor de F foi significativamente detectado pela ANOVA a 2 fatores, teste *post-hoc* de Tukey foi aplicado para a múltipla comparação entre as médias dos grupos avaliados. O nível de significância utilizado em todas as análises foi inferior a 5%, ou seja, $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Ingestão alimentar cumulativa durante a vigência do tumor

A ingestão alimentar cumulativa do grupo Sedentário Tumor durante a vigência do tumor (14 dias) apresentou redução de 24% ($p<0,05$) quando comparada ao grupo Sedentário Controle. A ingestão alimentar cumulativa do grupo Treinado Controle no mesmo período apresentou redução de 26% ($p<0,05$) quando comparada ao grupo Sedentário Controle. Não foi detectado diferença entre os grupos Treinado Tumor e Sedentário Tumor.

Figura 1 Ingestão alimentar cumulativa durante a vigência do tumor de Walker-256. * $p<0,05$ em relação ao grupo Sedentário Controle e # $p<0,05$ em relação ao grupo Sedentário Controle. Grupo Sedentário Controle (n°8), Grupo Sedentário portador do Tumor (n°8), Grupo Treinado Controle (n°7) e Grupo Treinado portador do Tumor (n°7).

5.2 Concentração sérica de leptina

A concentração sérica de Leptina no grupo Sedentário Tumor apresentou redução de 50% ($p<0,05$) quando comparada ao grupo Sedentário Controle, já o grupo Sedentário Pair-Fed apresentou redução de 63% ($p<0,05$) quando comparado ao grupo Sedentário Controle.

Quando os animais eram submetido ao protocolo de treinamento aeróbio, somente o grupo Pair-Fed apresentou redução de 71% ($p<0,05$) quando comparado ao grupo Treinado Controle.

Figura 2 Concentração sérica de leptina. * $p<0,05$ em relação ao grupo Sedentário Controle; # $p<0,05$ em relação ao grupo Sedentário Controle e & $p<0,05$ em relação ao grupo Treinado Controle. Grupo Sedentário Controle ($n^{\circ}8$), Grupo Sedentário portador do Tumor ($n^{\circ}8$), Grupo Sedentário Pair-Fed ($n^{\circ}8$), Grupo Treinado Controle ($n^{\circ}7$), Grupo Treinado portador do Tumor ($n^{\circ}7$) e Grupo Treinado Pair-Fed ($n^{\circ}7$).

5.3 Concentração sérica de corticosterona

A concentração sérica de Corticosterona não apresentou nenhum tipo de alteração nos diferentes grupos estudados.

Figura 3 Concentração sérica de corticosterona. Não houve diferença estatística. Grupo Sedentário Controle (n°8), Grupo Sedentário portador do Tumor (n°8), Grupo Sedentário Pair-Fed (n°8), Grupo Treinado Controle (n°7), Grupo Treinado portador do Tumor (n°7) e Grupo Treinado Pair-Fed (n°7).

5.4 RT-PCR do gene TNF- α no TARP

A expressão gênica do TNF- α no TARP foi aumentada 5 e 4 vezes ($p < 0,01$) no grupo Sedentário Pair-Fed em relação aos grupos Sedentário Controle e Sedentário Tumor respectivamente.

Quando os animais eram submetidos ao protocolo de treinamento aeróbio, a expressão gênica do TNF- α no TARP não era mais detectada.

Figura 4 Expressão gênica do TNF- α no TARP. * $p < 0,01$ em relação ao grupo Sedentário Controle e; # $p < 0,01$ em relação ao grupo Sedentário Tumor. Grupo Sedentário Controle (n°8), Grupo Sedentário portador do Tumor (n°8), Grupo Sedentário Pair-Fed (n°8), Grupo Treinado Controle (n°7), Grupo Treinado portador do Tumor (n°7) e Grupo Treinado Pair-Fed (n°7).

5.5 Quantificação do conteúdo de TNF- α no TARP

O conteúdo de TNF- α no TARP apresentou aumento no grupo Sedentário Tumor de 1,8 e 2 vezes ($p<0,01$) quando comparado ao grupo Sedentário Controle e Sedentário Pair-Fed respectivamente.

Quando os animais eram submetidos ao protocolo de treinamento aeróbio esse aumento não era mais visto.

Figura 5 Conteúdo de TNF- α no TARP. * $p<0,01$ em relação ao grupo Sedentário Controle; # $p<0,01$ em relação ao grupo Sedentário Tumor. Grupo Sedentário Controle (n°8), Grupo Sedentário portador do Tumor (n°8), Grupo Sedentário Pair-Fed (n°8), Grupo Treinado Controle (n°7), Grupo Treinado portador do Tumor (n°7) e Grupo Treinado Pair-Fed (n°7).

5.6 RT-PCR do gene TNF- α no TAME

A expressão gênica do TNF- α no TAME foi detectada somente nos grupos Sedentário Tumor e Sedentário Pair-Fed.

Figura 6 Expressão gênica do TNF- α no TAME. Grupo Sedentário Controle (n°8), Grupo Sedentário portador do Tumor (n°8), Grupo Sedentário Pair-Fed (n°8), Grupo Treinado Controle (n°7), Grupo Treinado portador do Tumor (n°7) e Grupo Treinado Pair-Fed (n°7).

5.7 Quantificação do conteúdo de TNF- α no TAME

O conteúdo de TNF- α no TAME apresentou aumento de 75% e 84% ($p < 0,01$) no grupo Treinado Controle e Treinado Pair-Fed respectivamente quando comparado aos grupos Sedentário Controle e Sedentário Pair-Fed, respectivamente.

Figura 7 Conteúdo de TNF- α no TAME. * $p < 0,01$ em relação ao grupo Sedentário Controle e; # $p < 0,01$ em relação ao grupo Sedentário Pair-Fed. Grupo Sedentário Controle (n°8), Grupo Sedentário portador do Tumor (n°8), Grupo Sedentário Pair-Fed (n°8), Grupo Treinado Controle (n°7), Grupo Treinado portador do Tumor (n°7) e Grupo Treinado Pair-Fed (n°7).

5.8 RT-PCR do gene IL-1 β no TARP

A expressão gênica da IL-1 β no TARP foi aumentada 3 e 2,5 vezes ($p<0,01$) no grupo Sedentário Pair-Fed em relação aos grupos Sedentário Controle e Sedentário Tumor respectivamente.

Quando os animais eram submetidos ao protocolo de treinamento aeróbio, a expressão gênica da IL-1 β no TARP foi reduzida 6 vezes ($p<0,01$) no grupo Treinado Pair-Fed, quando comparado ao grupo Sedentário Pair-Fed.

Figura 8 Expressão gênica da IL-1 β no TARP. * $p<0,01$ em relação ao grupo Sedentário Controle e Sedentário Tumor; # $p<0,01$ em relação ao grupo Sedentário Pair-Fed. Grupo Sedentário Controle (n°8), Grupo Sedentário portador do Tumor (n°8), Grupo Sedentário Pair-Fed (n°8), Grupo Treinado Controle (n°7), Grupo Treinado portador do Tumor (n°7) e Grupo Treinado Pair-Fed (n°7).

5.9 Quantificação do conteúdo de IL-1 β no TARP

O conteúdo de IL-1 β no TARP apresentou aumento no grupo Sedentário Tumor 1,9 e 2,1 vezes ($p<0,01$) quando comparado ao grupo Sedentário Controle e Sedentário Pair-Fed, respectivamente.

Quando os animais eram submetidos ao protocolo de treinamento aeróbio esse aumento não era mais visto.

Figura 9 Conteúdo de IL-1 β no TARP. * $p<0,01$ em relação ao grupo Sedentário Controle; # $p<0,01$ em relação ao grupo Sedentário Tumor. Grupo Sedentário Controle (n°8), Grupo Sedentário portador do Tumor (n°8), Grupo Sedentário Pair-Fed (n°8), Grupo Treinado Controle (n°7), Grupo Treinado portador do Tumor (n°7) e Grupo Treinado Pair-Fed (n°7).

5.10 RT-PCR do gene IL-1 β no TAME

A expressão gênica da IL-1 β no TAME não apresentou diferença estatística nos diferentes grupos estudados.

Figura 10 Expressão gênica da IL-1 β no TAME. Grupo Sedentário Controle (n°8), Grupo Sedentário portador do Tumor (n°8), Grupo Sedentário Pair-Fed (n°8), Grupo Treinado Controle (n°7), Grupo Treinado portador do Tumor (n°7) e Grupo Treinado Pair-Fed (n°7).

5.11 Quantificação do conteúdo de IL-1 β no TAME

O conteúdo de IL-1 β no TAME apresentou aumento somente no grupo Treinado Controle 1,2 vezes ($p<0,01$) quando comparado ao grupo Sedentário Controle.

Figura 11 Conteúdo de IL-1 β no TAME. * $p<0,01$ em relação ao grupo Sedentário Controle. Grupo Sedentário Controle (n°8), Grupo Sedentário portador do Tumor (n°8), Grupo Sedentário Pair-Fed (n°8), Grupo Treinado Controle (n°7), Grupo Treinado portador do Tumor (n°7) e Grupo Treinado Pair-Fed (n°7).

5.12 RT-PCR do gene IL-10 no TARP

A expressão gênica da IL-10 no TARP foi aumentada 76% e 2,9 vezes ($p<0,01$) no grupo Sedentário Pair-Fed em relação aos grupos Sedentário Controle e Sedentário Tumor respectivamente.

Quando os animais eram submetidos ao protocolo de treinamento aeróbio, a expressão gênica da IL-10 no TARP foi reduzida 46% ($p<0,05$) no grupo Treinado Pair-Fed quando comparado ao grupo Sedentário Pair-Fed.

Figura 12 Expressão gênica da IL-10 no TARP. * $p<0,01$ em relação ao grupo Sedentário Controle, # $p<0,05$ em relação ao grupo Sedentário Tumor; \$ $p<0,05$ em relação ao grupo Sedentário Pair-Fed. Grupo Sedentário Controle (n°8), Grupo Sedentário portador do Tumor (n°8), Grupo Sedentário Pair-Fed (n°8), Grupo Treinado Controle (n°7), Grupo Treinado portador do Tumor (n°7) e Grupo Treinado Pair-Fed (n°7).

5.13 Quantificação do conteúdo de IL-10 no TARP

O conteúdo de IL-10 no TARP apresentou aumento no grupo Sedentário Tumor 1,6 e 1,3 vezes ($p<0,01$) quando comparado aos grupos Sedentário Controle e Sedentário Pair-Fed, respectivamente.

Quando os animais eram submetidos ao protocolo de treinamento aeróbio esse aumento não era mais visto.

Figura 13 Conteúdo de IL-10 no TARP. * $p<0,01$ em relação ao grupo Sedentário Controle; # $p<0,01$ em relação ao grupo Sedentário Tumor. Grupo Sedentário Controle (n°8), Grupo Sedentário portador do Tumor (n°8), Grupo Sedentário Pair-Fed (n°8), Grupo Treinado Controle (n°7), Grupo Treinado portador do Tumor (n°7) e Grupo Treinado Pair-Fed (n°7).

5.14 RT-PCR do gene IL-10 no TAME

A expressão gênica da IL-10 no TAME não apresentou diferença estatística nos diferentes grupos estudados.

Figura 14 Expressão gênica da IL-10 no TAME. Grupo Sedentário Controle (n°8), Grupo Sedentário portador do Tumor (n°8), Grupo Sedentário Pair-Fed (n°8), Grupo Treinado Controle (n°7), Grupo Treinado portador do Tumor (n°7) e Grupo Treinado Pair-Fed (n°7).

5.15 Quantificação do conteúdo de IL-10 no TAME

O conteúdo de IL-10 no TAME apresentou aumento 1,2 e 1,3 ($p<0,01$) no grupo Treinado Controle e no Treinado Pair-Fed quando comparado aos grupos Sedentário Controle e Sedentário Pair-Fed respectivamente.

Figura 15 Conteúdo de IL-10 no TAME. * $p<0,01$ em relação ao grupo Sedentário Controle e; # $p<0,01$ em relação ao grupo Sedentário Pair-Fed. Grupo Sedentário Controle (n°8), Grupo Sedentário portador do Tumor (n°8), Grupo Sedentário Pair-Fed (n°8), Grupo Treinado Controle (n°7), Grupo Treinado portador do Tumor (n°7) e Grupo Treinado Pair-Fed (n°7).

5.16 Taxa IL-10/TNF- α no TARP

A taxa IL-10/TNF- α no TARP foi aumentada 12% e 24% ($p<0,05$) no grupo Sedentário Tumor e no grupo Sedentário Pair-Fed respectivamente em relação ao grupo Sedentário Controle. O aumento da taxa no grupo Sedentário Tumor foi ocasionado pelo maior aumento do conteúdo do TNF- α já o aumento visto no grupo Sedentário Pair-Fed foi ocasionado pelo maior aumento do conteúdo da IL-10. Quando os animais eram submetidos ao protocolo de treinamento aeróbio, somente o grupo Treinado Tumor apresentou aumento de 30% ($p<0,05$) na taxa IL-10/TNF- α quando comparado ao grupo Sedentário Tumor. Esse aumento foi acarretado pelo aumento superior encontrado no conteúdo da IL-10.

Figura 16 Taxa IL-10/TNF- α no TARP. * $p<0,05$ em relação ao grupo Sedentário Controle; # $p<0,01$ em relação ao grupo Sedentário Pair-Fed. Grupo Sedentário Controle ($n^{\circ}8$), Grupo Sedentário portador do Tumor ($n^{\circ}8$), Grupo Sedentário Pair-Fed ($n^{\circ}8$), Grupo Treinado Controle ($n^{\circ}7$), Grupo Treinado portador do Tumor ($n^{\circ}7$) e Grupo Treinado Pair-Fed ($n^{\circ}7$).

5.17 Participação de cada citocina na taxa IL-10/TNF- α no TARP

Figura 17 Participação do TNF- α e da IL-10 na taxa no TARP. * $p < 0,05$ em relação ao grupo Sedentário Controle; # $p < 0,05$ em relação ao grupo Sedentário Tumor Grupo Sedentário Controle (n°8), Grupo Sedentário portador do Tumor (n°8), Grupo Sedentário Pair-Fed (n°8), Grupo Treinado Controle (n°7), Grupo Treinado portador do Tumor (n°7) e Grupo Treinado Pair-Fed (n°7).

5.18 Taxa IL-10/TNF- α no TAME

A taxa IL-10/TNF- α no TAME foi aumentada 29% ($p<0,05$) no grupo Treinado Controle em relação ao grupo Sedentário Controle. O aumento da taxa no grupo Treinado Controle foi atribuída pelo maior aumento da IL-10 em relação ao TNF- α .

Figura 18 Taxa IL-10/TNF- α no TAME. * $p<0,05$ em relação ao grupo Sedentário Controle. Grupo Sedentário Controle (n°8), Grupo Sedentário portador do Tumor (n°8), Grupo Sedentário Pair-Fed (n°8), Grupo Treinado Controle (n°7), Grupo Treinado portador do Tumor (n°7) e Grupo Treinado Pair-Fed (n°7).

5.19 Participação de cada citocina na taxa IL-10/TNF- α no TAME

Figura 19 Participação do TNF- α e da IL-10 na taxa no TAME. * $p < 0,05$ em relação ao grupo Sedentário Controle. Grupo Sedentário Controle (n°8), Grupo Sedentário portador do Tumor (n°8), Grupo Sedentário Pair-Fed (n°8), Grupo Treinado Controle (n°7), Grupo Treinado portador do Tumor (n°7) e Grupo Treinado Pair-Fed (n°7).

5.20 RT-PCR do gene PPAR-gama no TARP

A expressão gênica do PPAR-gama no TARP foi aumentada 1,9 e 7 vezes ($p<0,01$) no grupo Sedentário Pair-Fed em relação aos grupos Sedentário Controle e Sedentário Tumor respectivamente.

Quando os animais eram submetidos ao protocolo de treinamento aeróbio, a expressão gênica do PPAR-gama no TARP foi reduzida 2 vezes ($p<0,01$) no grupo Treinado Pair-Fed quando comparado ao grupo Sedentário Pair-Fed.

Figura 20 Expressão gênica do PPAR-gama no TARP. * $p<0,01$ em relação ao grupo Sedentário Controle, # $p<0,01$ em relação ao grupo Sedentário Tumor; \$ $p<0,01$ em relação ao grupo Sedentário Pair-Fed. Grupo Sedentário Controle (n°8), Grupo Sedentário portador do Tumor (n°8), Grupo Sedentário Pair-Fed (n°8), Grupo Treinado Controle (n°7), Grupo Treinado portador do Tumor (n°7) e Grupo Treinado Pair-Fed (n°7).

5.21 RT-PCR do gene PPAR-gama no TAME

A expressão gênica da PPAR-gama no TAME não apresentou diferença estatística nos diferentes grupos estudados.

Figura 21 Expressão gênica da PPAR-gama no TAME. Grupo Sedentário Controle (n°8), Grupo Sedentário portador do Tumor (n°8), Grupo Sedentário Pair-Fed (n°8), Grupo Treinado Controle (n°7), Grupo Treinado portador do Tumor (n°7) e Grupo Treinado Pair-Fed (n°7).

5.22 Imunohistoquímica para MHC de classe II no TARP

Imunohistoquímica para MHC de classe II evidenciando presença de macrófagos infiltrados no TARP. Não observamos diferenças explícita na imunopositividade entre os grupos Sedentário Tumor e Treinado Tumor.

Controle Negativo

TARP Sedentário Tumor

TARP Treinado Tumor

Figura 22 Imunohistoquímica para MHC de classe II, evidenciando presença de macrófagos infiltrados no TARP. Grupo Sedentário portador do Tumor (n°3) e Grupo Treinado portador do Tumor (n°3).

5.23 Imunohistoquímica para MHC de classe II no TAME

Imunohistoquímica para MHC de classe II evidenciando presença de macrófagos infiltrados no TAME. Não observamos diferenças explícita na imunopositividade entre os grupos Sedentário Tumor e Treinado Tumor.

Controle Negativo

TAME Sedentário Tumor

TAME Treinado Tumor

Figura 23 Imunohistoquímica para MHC de classe II, evidenciando presença de macrófagos infiltrados no TAME. Grupo Sedentário portador do Tumor (n°3) e Grupo Treinado portador do Tumor (n°3).

5.24 Quantificação do número de macrófagos infiltrados no TARP

A quantificação do número de macrófagos infiltrados no TARP foi diminuída 73% ($p<0,01$) no grupo Sedentário Tumor quando comparado ao grupo Treinado Tumor.

Figura 24 Número de macrófagos infiltrados no TARP. * $p<0,01$ em relação ao grupo Sedentário Tumor. Grupo Sedentário portador do Tumor ($n^{\circ}9$) e Grupo Treinado portador do Tumor ($n^{\circ}6$).

5.25 Quantificação do número de macrófagos infiltrados no TAME

A quantificação do número de macrófagos infiltrados no TAME foi diminuída 65% ($p<0,01$) no grupo Sedentário Tumor quando comparado ao grupo Treinado Tumor.

Figura 25 Número de macrófagos infiltrados no TAME. * $p<0,01$ em relação ao grupo Sedentário Tumor. Grupo Sedentário portador do Tumor (n°9) e Grupo Treinado portador do Tumor (n°6).

6 DISCUSSÃO

A caquexia associada ao câncer é de etiologia desconhecida, e muito se especula sobre quais mecanismos a deflagram (ARGILES et al., 2003; TISDALE et al., 2005). O aumento da concentração de citocinas pró-inflamatórias circulantes é um fator importante que contribui para evolução da inflamação sistêmica, agravando ainda mais o quadro devastador induzido pela síndrome da caquexia. Atualmente a síndrome da caquexia-anorexia é concebida como estado inflamatório crônico, que resulta em intensa depleção dos tecidos adiposo e muscular (PLATA-SALAMÁN et al., 1998). As citocinas pró-inflamatórias possuem papel primordial na inibição da ingestão alimentar posto que inibem a comunicação hipotalâmica modulada pela leptina, tendo enorme contribuição do TNF- α e IL-1 β .

A IL-1 β esta intimamente ligada a diminuição da ingestão alimentar, sendo seu aumento correlacionado com surgimento da anorexia associada ao câncer. Em nosso estudo, o conteúdo protéico da IL-1 β no TARP foi aumentado nos animais caquéticos. Este incremento pode favorecer a instalação da anorexia encontrada em nosso modelo, podendo este ser direcionado para sítios hipotalâmicos, modulando neuropeptídios que regulam o comportamento alimentar, exarcebando o quadro (INUI, 2006).

Corroborando com esses resultados, foi observado redução na concentração de leptina circulante nos animais caquéticos.

O controle da ingestão alimentar em condições fisiológicas normais, é finamente regulada pela adiposidade corporal, mediado entre outros fatores, pela secreção da leptina pelo tecido adiposo (SCHWARTZ et al., 1999). Este hormônio possui ação direta no sistema nervoso central, agindo através de seu receptor (OB-Rb) hipotalâmico. No hipotálamo, o neuropeptídio Y (NPY) está intimamente ligado ao mecanismo do controle alimentar e sua expressão é regulada especialmente pela leptina que quando em concentração elevada, inibe sua ação, reduzindo a ingestão alimentar (INUI, 1999). Quando a concentração de leptina está reduzida, a expressão do NPY aumenta, estimulando a ingestão alimentar (INUI, 1999). Essa harmonia é perdida quando a síndrome da caquexia está presente, pois mesmo com a redução na concentração de leptina circulante encontrada nos animais caquéticos, os mesmos tiveram sua ingestão alimentar reduzida.

Estudos prévios demonstraram a instalação da anorexia em animais portadores do tumor de Walker-256, ocorrendo redução nas concentrações plasmáticas de leptina, acarretando também redução nas concentrações de leptina nos diferentes depósitos de tecido adiposo (MACHADO et al., 2004). Estas alterações foram acompanhadas pela presença exarcebada de monócitos infiltrados no tecido adiposo, podendo estas células ter importante papel nas alterações instaladas.

Estudos conduzidos por McCarthy e colaboradores (1993) mostraram que a expressão do NPY estava aumentada em animais caquéticos quando comparado ao grupo controle, não justificando a diminuição da ingestão alimentar, já que o NPY estimula esse parâmetro. Resultados semelhantes foram encontrados por Bing et al (2001), quando camundongos caquéticos portadores do tumor MAC16, tiveram a concentração de leptina circulante reduzida e aumento no mRNA de seu receptor (OB-Rb) no hipotálamo, seguido do aumento do mRNA do NPY hipotalâmico. Contudo, esses animais tiveram sua ingestão alimentar suprimida. Os mesmos autores ainda sugerem que a supressão da ingestão alimentar possa ocorrer provavelmente pela ação de proteínas derivadas do tumor, que possivelmente inibem o transporte e/ou liberação do NPY, e/ou interferem com a ligação do NPY a seus neurônios alvos.

O fator liberador de corticotropina (CRF) também exerce importante papel no controle da ingestão alimentar (ARGILÉS et al., 2003). Quando aumentado, esse fator exarceba a anorexia (INUI, 1999). Como sua produção hipotalâmica regula diretamente a produção de glicocorticóides (corticosterona), produzido pela adrenal, avaliamos a concentração desse hormônio, como forma indireta de examinar a produção de CRF.

Sabe-se que a síntese do CRF é regulada pelo aumento na concentração de $\text{TNF-}\alpha$ e $\text{IL-}\beta$, fatores circulantes presentes na caquexia (ARGILES e LOPEZ-SORIANO, 1999). A concentração circulante da corticosterona não foi, contudo, diferente nas das condições experimentais avaliadas. Tal resultado pode ser explicado, pelo menos parcialmente, pelo horário do sacrifício dos animais, tipo de sacrifício (anestesia ou decapitação), entre outros (LLOVERA et al., 1995).

Quanto à caquexia associada ao câncer e tecido adiposo

O carcinosarcoma de Walker-256 mostra algumas peculiaridades, havendo atualmente duas variações de linhagem, uma mais agressiva, que induz rapidamente a morte o indivíduo portador, e outra, menos agressiva, que induz efeitos sistêmicos importantes causando a instalação da síndrome da caquexia associada ao câncer (PERROUD et al., 2007).

Conforme descrito pelo grupo da Prof^a Seelaender e outros (FERNANDES et al., 1990; MACHADO et al., 2004; KAZANTZIS e SEELAENDER, 2005; LIRA et al., 2008a), o tumor de Walker-256 impõe ao organismo portador sintomas clássicos da síndrome da caquexia associada ao câncer: diminuição na ingestão alimentar (anorexia), diminuição na concentração circulante de leptina, hipertriglicidemia, esteatose hepática, redução no ganho de peso corpóreo, entre outros. O tecido adiposo é marcadamente afetado, havendo uma intensa depleção de seu conteúdo de ácidos graxos, modificação morfológica (BERTEVELLO e SEELAENDER, 2001; BING et al., 2001) e alterações na expressão e produção de diferentes adipocinas e ainda, presença de infiltrantes inflamatórios (ARGILES et al., 2003; MACHADO et al., 2004; TISDALE, 2005).

Em nosso estudo, avaliamos o efeito da caquexia associada ao câncer sobre dois depósitos do tecido adiposo de ratos portadores do tumor de Walker 256. Primeiramente, no tecido adiposo retroperitoneal (TARP), cuja característica predominante é de depósito energético, sendo de grande importância para o fornecimento de ácido graxos em situações de privação energética e/ou aumento da demanda energética (ENEVOLDSEN et al., 2001; YAMASHITA et al., 2008). Como mencionado na introdução, o tecido adiposo periférico é hoje considerado também um órgão endócrino importante, e o TARP também exerce esse papel. Assim como outros depósitos secreta hormônios, citocinas e outros fatores, etc. (HUBE et al., 1999).

O tecido adiposo branco é um órgão heterogêneo, tendo cada depósito uma determinada característica e função (TRAYHURN e BEATTIE, 2001). Assim, isso deve ser considerado no estudo de seu metabolismo e fisiologia, uma vez que este tecido não consiste somente de adipócitos, mas também de fração estromal vascular, fibroblastos, macrófagos, entre diversos outros tipos celulares (TRAYHURN e BEATTIE, 2001). Sabe-se ainda que em algumas condições patológicas, tais como na obesidade, câncer, entre

outros, o tecido adiposo apresenta células imunológicas infiltradas, podendo estas células ter um importante papel na produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α (TRAYHURN e BEATTIE, 2001; MACHADO et al., 2004).

As citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-1 β) possuem ações pleotróficas, participando desde a resposta inflamatória crônica encontrada no tecido adiposo de indivíduos obesos, até auxiliando na possível mobilização de ácidos graxos do tecido adiposo para fornecimento de substratos energéticos para o trabalho muscular durante exercício aeróbio moderado (NARA et al., 2001; LIRA et al., 2008).

Os distintos efeitos das citocinas pró-inflamatórias sobre o metabolismo lipídico no tecido adiposo de animais caquéticos tem sido demonstrado por estudos prévios (SEELAENDER et al., 1996; COSTELLI et al., 1999), uma vez que animais caquéticos apresentam aumento nas concentrações plasmática de triacilglicerol e colesterol (SEELAENDER et al., 1996; COSTELLI et al., 1999; LIRA et al., 2008), proporcionado pelo aumento da lipólise e diminuição da lipase lipoprotéica no tecido adiposo, o que favorece o aumento na mobilização dos ácidos graxos e diminuição na reincorporação dos mesmos pelo tecido adiposo. Este mecanismo é agravado também pela ineficiência do fígado em processar os ácidos graxos circulantes provindos da lipólise exarcebada (SEELAENDER et al., 1998).

O aumento das citocinas pró-inflamatórias encontrado neste depósito específico (TARP) no presente estudo, pode ser decorrente da produção local e/ou produção dessas proteínas por outras células (ex: músculo esquelético, macrófagos peritoneal, fração estromal vascular, entre outras (TRAYHURN e BEATTIE, 2001), porém não foram verificadas alterações na expressão gênica destas proteínas neste tecido.

Indivíduos obesos apresentam aumento na expressão gênica dos receptores de TNF- α no tecido adiposo subcutâneo quando comparado ao tecido adiposo omental. Tomados em conjunto, esses resultados apontam que os depósitos adiposos que têm características mais relacionadas ao fornecimento de energia (subcutâneo, retroperitoneal, etc.) possuem maior aceptividade para ligação do TNF- α em relação ao tecido adiposo visceral (omental, mesentérico, etc.) (HUBE et al., 1999). Isto sugere que o aumento encontrado no TARP possa ter relação ao acoplamento das citocinas provindas de outros tecidos a seus respectivos receptores.

Em paralelo ao aumento das citocinas pró-inflamatórias, observamos em nosso estudo, aumento no conteúdo da IL-10 no TARP nos animais caquéticos, sem alterações na expressão gênica.

A IL-10 pode inibir a produção de várias citocinas, tais como: TNF- α , IL-1 β e IL-6, em uma variedade de tipos celulares, além de exercer auto-modulação de sua síntese (MALEFYT et al., 1991; MOORE et al., 1993). Além disso, estudos têm demonstrado que a IL-10 tem sua produção aumentada em processos inflamatórios (ESPOSITO et al., 2003; JUNG et al., 2007; BATISTA, 2007), exercendo função predominantemente imunomoduladora nessas condições (KATSIKIS et al., 1994; DAFTARIAN et al., 1996). Essa linha de raciocínio sugere que a IL-10 atuaria como um mecanismo de retroalimentação negativa ao excesso de citocinas pró-inflamatórias, como por exemplo, de TNF- α (BATISTA, 2007). Bolger et al. (2003) demonstraram que a IL-10 inibe a secreção de TNF- α em células mononucleares do sangue periférico isolada (*ex vivo*) de pacientes com infarto do miocárdio. Em outro estado inflamatório crônico, como a aterosclerose em camundongos (C57BL/6J, *knockout* para IL-10) a IL-10 demonstrou propriedades protetoras (anti-inflamatórias) retardando a progressão da doença, tanto que altas concentrações de IL-10 foram associados à diminuição da apoptose e expressão de mRNA da iNOS 1 em células endoteliais, macrófagos e linfócitos T desses animais (MALLAT et al., 1999).

A taxa IL-10/TNF- α vem sendo utilizada como um marcador da intensidade do estado inflamatório, tanto em sujeitos no estado pós-operatório, indivíduos e animais obesos e, recentemente, em animais infartados (JUNG et al., 2007; BATISTA, 2007). Um desvio desta taxa para o estado pró-inflamatório está intimamente relacionado à sobrevida e risco de síndrome metabólica (ESPOSITO et al., 2003). Em nosso estudo observamos que o TARP dos animais caquéticos apresentou aumento nesta taxa, porém, isso decorreu por incremento do TNF- α e a redução da IL-10. Dessa forma, o quadro tende a um estado pró-inflamatório. Mudanças foram observadas também nos animais que tiveram sua alimentação pareada com as dos animais caquéticos, que mostraram igualmente dessa taxa, indicando, contrariamente, para um estado majoritariamente anti-inflamatório, posto que a IL-10 teve aumento superior ao TNF- α .

Estes resultados sugerem que, o tecido adiposo retroperitoneal dos animais caquéticos encontra-se com *milieu* favorável ao estado pró-inflamatório. Nesse aspecto, a presença do tumor e a reação do organismo ao mesmo foi determinante para este quadro, pois animais *pair-fed* mostraram um desvio da taxa no sentido anti-inflamatório.

Levando-se em consideração esses resultados observados no TARP e sabendo que ambos os depósitos apresentaram MØ infiltrados, especulamos as seguintes hipóteses: (1) O aumento no conteúdo destas citocinas pró-inflamatórias esta sendo modulados tanto pelos adipócitos, quanto pelos MØ infiltrados, uma vez que, estudos conduzidos por Machado et al (2004) demonstraram que estes possuem alta capacidade de produzir proteínas relacionadas com a inflamação; (2) Esse acúmulo de citocinas pró-inflamatórias no TARP é decorrente do aumento dos respectivos receptores de diversas citocinas no tecido, conforme já observado no estudo de Figueras et al (2005), que são oriundas da circulação ou de células próximas, (3) Ou ainda, da conjuntura das duas hipóteses supracitadas.

Diferentemente do TARP, o TAME é um depósito anatomicamente íntimo aos linfonodos, relacionadas à resposta inflamatória (GOTTSCHLING-ZELLER et al., 2000; POND, 2003). Neste depósito específico, encontramos somente alteração na expressão gênica do TNF- α nos animais caquéticos, sem alterações nos níveis proteicos desta citocina.

Assim, tendo em vista o papel imunomodulatório do TAME, o aumento na expressão gênica do TNF- α neste tecido nos animais caquéticos, bem como a ausência do acúmulo de sua proteína, podem ser explicadas pelo possível desvio desta citocina para a circulação, não necessitando o próprio tecido de acumular quantidades expressivas da mesma. O processo de liberação do TNF- α do tecido é regulado pela metaloproteinase conversora de TNF- α (TACE) (BLACK et al., 1993). Desta forma, ocorreria um sincronismo entre a amplificação gênica, tradução e liberação do TNF- α para tecidos adjacentes e/ou para circulação.

O aumento na expressão gênica e produção de citocinas pró-inflamatórias no tecido adiposo de animais portadores de doenças têm sido frequentemente observados (BASTARD et al., 2000; TRAYHURN e BEATTIE, 2001; FIGUERAS et al., 2005; WU et al., 2007). Os adipócitos são células capazes de produz concentrações elevadas de citocinas

pró-inflamatórias em situações diversas. Estudos conduzidos por Wu et al (2007), demonstraram que em animais envelhecidos, a expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β e IL-6) aumenta e ocorre diminuição de um fator envolvido na resposta anti-inflamatória (PPAR- γ). No entanto, diferentemente do que ocorre na obesidade e no câncer, o tecido adiposo destes animais não apresentou aumento na infiltração de macrófagos, sendo os adipócitos os maiores responsáveis pela produção destas adipocinas (WU et al., 2007). Os mecanismos exatos pelo quais os adipócitos aumentam a expressão gênica desta adipocinas são obscuros, porém, os autores supracitados sugerem que o NF- κ B tem inequívoca contribuição, pois ao inibi-lo com droga específica (ceramida), o aumento da expressão gênica das adipocinas pró-inflamatórias não foi mais observada. Em nosso estudo, não observamos mudanças na expressão gênica do PPAR- γ .

Ambos os depósitos de tecido adiposo dos animais caquéticos (Mesentérico e Retroperitoneal) apresentaram presença de MØ infiltrados em abundância. A aplicação do protocolo de treinamento, além de proporcionar aumento na taxa IL-10/TNF- α no TARP, proporcionou redução no número de MØ infiltrados, em ambos os depósitos de tecido.

Pouco se sabe, entretanto, sobre o papel dos MØ infiltrados no tecido adiposo de animais caquéticos, porém, uma vasta literatura é encontrada no que diz respeito á esse fenômeno em animais e sujeitos obesos (TRAYHURN e BEATTIE, 2001; PERMANA et al., 2006; BRUUN et al., 2006). A migração dos macrófagos para o tecido adiposo em indivíduos obesos é mediado pela proteína quimioatratante de monócitos 1 (MCP-1), que modula a migração de macrófagos para os tecidos próximos. Essa propriedade do macrófago em migrar para os tecidos não é exclusivo do tecido adiposo, podendo este ser direcionar também para o músculo esquelético (PETERSON et al., 2006).

O MØ infiltrado em ratos caquéticos pode, em parte, favorecer um *milieu* inflamatório, conforme observado na obesidade, contribuindo para os distúrbios metabólicos, agravamento da caquexia e depleção dos depósitos de gordura. Durante o processo inflamatório, a MCP-1 possui um importante papel, sua principal função é promover a atração de monócitos, linfócitos T e células matadoras naturais (*Natural Killer*) para o sítio de inflamação (BRUUN et al., 2006).

O perfil traçado em nosso estudo, referente à primeira pergunta proposta, que objetivou analisar o balanço de citocinas anti e pró-inflamatórias no tecido adiposo de animais caquéticos, levanta uma série de perguntas. O tecido adiposo dos animais caquéticos teria participação em fornecer citocinas para circulação sistêmica, contribuindo para agravamento do quadro da caquexia? Será que ocorre a infiltração de MØ ou ocorre diferenciação de pré-adipócitos para MØ? O que poderia acarretar tal fenômeno?

Quanto aos efeitos do treinamento aeróbio em ratos portadores do tumor

Nos últimos anos, o emprego do exercício físico como estratégia complementar ao tratamento de doenças crônicas tem despertado grande interesse da comunidade científica. Neste aspecto, vários estudos vêm sendo conduzidos para o melhor entendimento dos processos pelos quais o exercício físico poderia ter papel terapêutico em quadros patológicos, notadamente em condições inflamatórias crônicas que culminam em alterações sistêmicas na concentração de citocinas pró-inflamatórias (PEDERSEN, 2007). Entre as várias abordagens que vem sendo utilizadas para explicar tal relação, destacamos a abordagem neuroimunoendócrina, que propõe que distúrbios nesse eixo podem culminar em algumas doenças, entre essas a caquexia associada ao câncer (MARTINS et al., 1998). Seguindo essa linha de raciocínio, vários estudos dos grupos dos Profs. Costa Rosa e Seelaender têm demonstrado o efeito da aplicação do programa de exercícios físicos na atenuação e/ou restauração em parâmetros inflamatórios, nas condições supracitadas (BACURAU et al., 2000; CUNHA et al., 2004; BATISTA et al., 2007; BATISTA, 2007; BATISTA et al., 2008; LIRA et al., 2008).

Estudos prévios de nosso grupo (SEELAENDER et al. 1996, 1998, 1999, KAZANTZIS e SEELAENDER, 2005) apontam alterações no metabolismo lipídico no fígado de animais caquéticos. Lira et al (2008) verificaram que a aplicação do programa de treinamento aeróbio em animais portadores do tumor de Walker 256, induziu a abolição dos sintomas clássicos da caquexia nos ratos portadores do tumor, normalizando diversos parâmetros do metabolismo lipídico no fígado. Essa melhora foi refletida sistemicamente, pois o perfil lipídico plasmático foi restaurado a valores próximos aos encontrados nos animais controle. Ainda demonstrou-se que o peso absoluto do tumor foi reduzido em cerca

de 10 vezes nos animais treinados, quando comparado aos animais sedentário (Lira et al., 2008a).

A aplicação do protocolo de treinamento aeróbio mostra eficiência em restaurar e/ou prevenir o metabolismo e função de macrófagos e linfócitos de ratos portadores do tumor de Walker-256, bem como em animais com insuficiência cardíaca (IC), nos estudos supracitados. Mais recentemente, o Prof. Batista (Co-orientador do presente trabalho) demonstrou que a aplicação do protocolo de treinamento aeróbio em animais com IC, amenizou e, em relação a alguns parâmetros, restaurou a expressão gênica e protéica de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α) no músculo esquelético (Sóleo). Concomitadamente, seu estudo apontou um aumento no conteúdo da IL-10 induzido pelo programa de treinamento, o que pode ter um papel importante na resposta anti-inflamatória neste tecido (BATISTA, 2007).

No presente estudo, observamos que os animais treinados portadores do tumor não apresentaram o mesmo padrão no conteúdo de citocinas pró-inflamatória (TNF- α e IL-1 β) no TARP apresentado pelo grupo caquético e tampouco ocorreu aumento significativo na concentração da citocina anti-inflamatória (IL-10). Porém, ao analisar-se a taxa IL-10/TNF- α no TARP nos animais treinados portadores do tumor, observou-se incremento quando comparado aos animais caquéticos sedentários. Tal fato foi acarretado pelo aumento superior da IL-10 em relação ao TNF- α , direcionando à resposta anti-inflamatória.

Pedersen e Fischer (2007) sugerem que o efeito anti-inflamatório induzido pelo exercício provém do aumento, primeiramente da IL-6, seguido pelo aumento do receptor antagonista da IL-1 β (IL-1ra) e da IL-10. A IL-6 é considerada uma citocina imunomodulatória. O efeito anti-inflamatório da IL-6 é também demonstrado pelo fato de que ela estimula a produção da IL-1ra e da IL-10 (STEENSBERG et al., 2003). Ainda, a IL-6 estimula a liberação do receptor solúvel do TNF- α (TILG et al., 1997), o qual bloqueia a ação do TNF- α .

Assim, apesar do efeito anti-inflamatório de uma sessão aguda estar bem caracterizada, apenas recentemente tem se estudado o efeito crônico da atividade física. Desta forma, pouco se conhece o efeito crônico do exercício (treinamento) sobre a síntese de citocinas pró-inflamatórias (CHEN et al., 2007; SLOAN et al., 2007). Os estudos conduzidos por Chen e colegas demonstraram que ratos treinados por 4 semanas em

intensidade moderada, quando submetidos à infusão de LPS por 20 minutos, mostram redução da sua capacidade de produção de TNF- α e IL-1 β por monócitos e neutrófilos (isolados do sangue) em relação ao grupo sedentário. Resultados semelhantes foram encontrados no estudo de Sloan e colegas, no qual sujeitos sedentários foram submetidos a um programa de treinamento por 12 semanas, em duas intensidades (moderada, 60% da frequência cardíaca máxima e alta, 75% e 80% da frequência cardíaca máxima). Quando células sanguíneas (monócitos) foram estimuladas com LPS (antes e após o treinamento) a capacidade de produção do TNF- α no grupo treinado em alta intensidade foi reduzida em relação à pré-treinamento, já o grupo que treinou em intensidade moderada não apresentou diferença. Ambos os trabalhos supracitados atribuem essa menor produção de TNF- α pelas células sanguíneas, aos efeitos anti-inflamatórios do treinamento.

Resultados prévios (LIRA et al., 2008b), indicam que o tecido adiposo mesentérico de ratos submetidos ao protocolo de treinamento aeróbico crônico (8 semanas, 5 vezes por semana, 60% do VO_{2máx}), mostrou aumento na concentração de TNF- α e aumento ainda superior da IL-10 quando comparados ao grupo sedentário. Os autores atribuem ao aumento do TNF- α , um possível papel modulador no metabolismo lipídico, proporcionando lipólise em tecidos adjacentes. O aumento superior da IL-10 ocorreria para proporcionar o bloqueio dos possíveis efeitos deletérios causados pelo TNF- α . Este raciocínio fica mais evidente quando a taxa IL-10/TNF- α é observada, a qual esteve aumentada no grupo treinado em relação ao grupo sedentário. A modulação no perfil das citocinas no tecido adiposo dos animais treinados no estudo supracitado não foi acompanhada por aumento do monócito infiltrante neste tecido, como é observado em outras situações, sendo portanto, os adipócitos os maiores responsáveis por estas alterações.

Gomez-Merino e colegas (2007), após submeterem animais ao protocolo de treinamento intenso por 7 semanas, observaram aumento na concentração de IL-1 α , IL-1 β e IL-12 no tecido adiposo em relação ao grupo sedentário. As concentrações de TNF- α e IL-10 não apresentaram diferenças. Temos que ressaltar que a intensidade, volume e a duração da aplicação do protocolo de treinamento são variáveis determinantes na modulação das citocinas (PETERSEN e PEDERSEN, 2005). Ainda, bem como observado no estudo de Lira et al (2008b), e no presente trabalho, os diferentes depósitos de tecidos adiposos respondem de maneira particular aos estímulos fisiopatológicos.

Observamos ainda que, os animais submetidos ao protocolo de treinamento aeróbio apresentaram redução no número de MØ infiltrados nos depósitos de tecido adiposo examinados. Este resultado só pôde ser comprovado quando realizamos o isolamento destes células dos tecidos adiposos, pois o método de imunohistoquímica não possibilitou distinguir esta diferença.

Conforme relatado anteriormente, sabe-se que o aumento da expressão gênica e proteica da MCP-1 está intimamente relacionada ao acúmulo de MØ no tecido adiposo de indivíduos obesos (BRUUN et al., 2006; PERMANA et al., 2006). Indivíduos obesos quando submetidos à dieta hipocalórica e programa de treinamento aeróbio, apresentam redução de peso. No entanto, estudo de Bruun et al. (2006), mostrou que essa redução de peso foi acompanhada pela diminuição da concentração circulante de MCP-1 e do número de MØ infiltrados no tecido adiposo subcutâneo. Estudos realizados por Yang e Chen (2003), já indicam que a aplicação do protocolo de treinamento foi eficiente em diminuir o conteúdo proteico da MCP-1 na artéria de ratos submetidos a dieta hiperlipídica (YANG e CHEN, 2003). Os mecanismos que acarretam tais resultados, contudo ainda não foram descritos.

A elucidação do papel dos monócitos infiltrantes no tecido adiposo ainda é bastante debatido no âmbito da obesidade (BRUNN et al., 2006; PERMANA et al., 2006). Recentemente foi mostrado que o monócito infiltrado no tecido adiposo pode originar-se tanto por diferenciação dos pré-adipócitos, quanto ser recrutados mediados pela MCP-1 (NGUYEN et al., 2007). Tal fato determina sua funcionalidade, posto que determina o tipo de proteína que essa célula infiltrada vai secretar, por ex: TNF- α ou IL-10. No entanto, a respeito dos monócitos infiltrados nos depósitos de tecido adiposo em animais caquéticos nada é conhecido.

A idéia do exercício físico moderado realizado de maneira contínua, induzir efeitos anti-inflamatórios, minimizando e/ou impedindo a instalação de doenças crônicas degenerativas, é de interesse global, pois o melhor entendimento de tais efeitos é de suma importância para sua utilização em âmbito clínico.

7 CONCLUSÃO

Assim, podemos afirmar que foi demonstrado que no estado inflamatório crônico da caquexia o tecido adiposo é bastante afetado, reagindo à síndrome de forma heterogênea, de acordo com o depósito. O balanço IL-10/TNF- α no tecido adiposo mostrou-se um bom marcador do grau de inflamação.

O exercício físico crônico reverteu o quadro inflamatório no tecido adiposo de ratos caquéticos. Portanto, sugere-se que o protocolo de atividade adotado tenha grande potencial terapêutico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ANKER, S.; COATS, A. Cardiac Cachexia: A syndrome with impaired survival and immune and neuroendocrine activation. **Chest**, v.115, n.3, p.836-47. 1999.

ARGILÉS, J.; ALVAREZ, B.; LÓPEZ-SORIANO, F. The metabolic basis of cancer cachexia. **Med. Res. Rev.**, v.17, n.5, p.477-98. 1997.

ARGILÉS, J.; MOORE-CARRASCO, R.; BUSQUETS, S.; LÓPEZ-SORIANO, FJ. Catabolic mediators as targets for cancer cachexia. **Drug. Discov. Today**, v.15, n.8, p. 838-44. 2003.

BACUAU, R.; BELMONTE, M.; SEELAENDER, M.; COSTA ROSA, L. Effect of a moderate intensity exercise training protocol on the metabolism of cachectic rats bearing the Walker 256 lymphocytes of tumour-bearing rats. **Cell. Biochem. Funct.**, v.18, n.4, p. 249-58. 2000.

BASTARD, J.; JARDEL, C.; BRUCKERT, E.; BLONDY, P.; CAPEAU, J.; LAVILLE, M.; VIDAL, H.; HAINQUE, B. Elevated levels of interleukin 6 are reduced in serum and subcutaneous adipose tissue of obese women after weight loss. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v.85, n.9, p.3338-42, 2000.

BATISTA, M.; SANTOS, R.; LOPES, R.; LOPES, A.; COSTA ROSA, L.; SEELAENDER, M. Endurance training modulates lymphocyte function in rats with post-MI CHF. **Med. Sci. Sports. Exerc.**, 2007: in press.

BATISTA, M.; SANTOS, R.; OLIVEIRA, E.; SEELAENDER, M.; COSTA ROSA, L. Endurance training restores peritoneal macrophage function in post-MI congestive heart failure rats. **J. Appl. Physiol.**, v.102, n.5, p.2033-9, 2007.

BATISTA, M. **Alterações na produção de TNF-alfa e IL-10 no músculo esquelético de ratos com insuficiência cardíaca secundária a infarto do miocárdio**: Possível efeito antiinflamatório do treinamento aeróbico moderado. Dissertação (Doutorado em Biologia Celular e Tecidual) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

BERTEVELLO, P.; SEELAENDER, M. Heterogeneous response of adipose tissue to cancer cachexia. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.34, n.9, p.1161-7, 2001.

BING, C.; RUSSELL, S.; BECKET, E.; POPE, M.; TISDALE, M.; TRAYHURN, P.; JENKINS, JR. Adipose atrophy in cancer cachexia: morphologic and molecular analysis of adipose tissue in tumour-bearing mice. **Br. J. Cancer**, n.23, v.8, p.1028-37, 2006.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BING, C.; TAYLOR, S.; TISDALE, M.; WILLIAMS, G. Cachexia in MAC16 adenocarcinoma: suppression of hunger despite normal regulation of leptin, insulin and hypothalamic neuropeptide Y. **J. Neurochem.**, v.79, n.5, p.1004-12, 2001.

BOLGER, A.; SHARMA, R.; VON HAEHLING, S.; DOEHNER, W.; OLIVER, B.; RAUCHHAUS, M.; COATS, A.; ADCOCK, I.; ANKER, S. Effect of interleukin-10 on the production of tumor necrosis factor-alpha by peripheral blood mononuclear cells from patients with chronic heart failure. **Am. J. Cardiol.**, v.15, n.4, p.384-9, 2002.

BOSSOLA, M.; PACELLI, F.; DOGLIETTO, G. Novel treatments for cancer cachexia. **Expert. Opin. Investig. Drugs.**, v.16, n.8, p.1241-53, 2007.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v.72, n. 2, p.248-54, 1976.

BRUERA, E.; SELMSER, P.; PEREIRA, J.; BRENNEIS, C. Bus rounds for palliative care education in the community. **CMAJ**, v.15, n.6, p.701-2, 1997.

BRUUN, J.; HELGE, J.W.; RICHELSEN, B.; STALLKNECHT, B. Diet and exercise reduce low-grade inflammation and macrophage infiltration in adipose tissue but not in skeletal muscle in severely obese subjects. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v.290, n. 5, p.E961-7, 2006.

CHEN, H.; HSIEH, S.; YANG, F.; HSU, Y.; LIN, C. Exercise training attenuates septic responses in conscious rats. **Med. Sci. Sports. Exerc.**, v.39, n.3, p.435-42, 2007.

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Anal. Biochem.**, v.162, n.1, p. 156-9, 1987.

COPPACK, S. Pro-inflammatory cytokines and adipose tissue. **Proc. Nutr. Soc.**, v.60, n.3, p.349-56, 2001.

COSTA ROSA, L.F. Exercise as a Time-conditioning Effector in Chronic Disease: a Complementary Treatment Strategy. **Evid. Based. Complement. Alternat. Med.**, v.1, n.1, p.63-70, 2004.

COSTELLI, P.; TESSITORE, L.; BATETTA, B.; MULAS, M.; SPANO, O.; PANI, P.; BACCINO, F.; DESSI, S. Alterations of lipid and cholesterol metabolism in cachectic tumor-bearing rats are prevented by insulin. **J. Nutr.**, v.129, n.3, p.700-6, 1999.

CUNHA, W.; GIAMPIETRO, M.; DE SOUZA, D.; VAISBERG, M.; SEELAENDER, M.; ROSA, L. Exercise restores immune cell function in energy-restricted rats. **Med. Sci. Sports. Exerc.**, v.36, n.12, p.2059-64, 2004.

DAFTARIAN, P.; KUMAR, A.; KRYWORUCHKO, M.; DIAZ-MITOMA, F. IL-10 production is enhanced in human T cells by IL-12 and IL-6 and in monocytes by tumor necrosis factor-alpha. **J. Immunol.**, v.157, n1, p12-20, 1996.

DELERIVE, P.; FRUCHART, J.; STAELS, B. Peroxisome proliferator-activated receptors in inflammation control. **J. Endocrinol.**, v.169, n.3, p.453-9, 2001.

ESPOSITO, K.; PONTILLO, A.; GIUGLIANO, F.; GIUGLIANO, G.; MARFELLA, R.; NICOLETTI, G.; GIUGLIANO, D. Association of low interleukin-10 levels with the metabolic syndrome in obese women. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v.88, n.3, p.1055-8, 2003.

ENEVOLDSEN, L.; STALLKNECHT, B.; LANGFORT, J.; PETERSEN, L.; HOLM, C.; PLOUG, T.; GALBO, H. The effect of exercise training on hormone-sensitive lipase in rat intra-abdominal adipose tissue and muscle. **J. Physiol.**, v.1, n.3, p.871-7, 2001.

FEARON, K.; MOSES, A. Cancer cachexia. **Int. J. Cardiol.**, v.85, n.1, p.73-81, 2002.

FELDMANN, M.; BRENNAN, F.; ELLIOTT, M.; KATSIKIS, P.; MAINI, R. TNF alpha as a therapeutic target in rheumatoid arthritis. **Circ. Shock.**, v.43, n.4, p.179-84, 1994.

FERNANDES, L.; MACHADO, U.; NOGUEIRA, C.; CARPINELLI, A.; CURI, R. Insulin secretion in Walker 256 tumor cachexia. **Am. J. Physiol.**, v.258, n.6, p.E1033-6, 1990.

FERRARI, R.; BACHETTI, T.; CONFORTINI, R.; OPASICH, C.; FEBBO, O.; CORTI, A.; CASSANI, G.; VISIOLI, O. Tumor necrosis factor soluble receptors in patients with various degrees of congestive heart failure. **Circulation**, v.15, n.6, p.1379-82, 1995.

FIGUERAS, M.; BUSQUETS, S.; CARBÓ, N.; ALMENDRO, V.; ARGILÉS, J.; LÓPEZ-SORIANO, F. Cancer cachexia results in an increase in TNF-alpha receptor gene expression in both skeletal muscle and adipose tissue. **Int. J. Oncol.**, v.27, n.3, p.855-60, 2005.

FINCK, B.; JOHNSON, R. Tumor necrosis factor-alpha regulates secretion of the adipocyte-derived cytokine, leptin. **Microsc. Res. Tech.**, v.1, n.3, p.209-15, 2000.

FIORENTINO, D.; ZLOTNIK, A.; MOSMANN, T.; HOWARD, M.; O'GARRA, A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. **J. Immunol.**, v.1, n.11, p.3815-22, 1991.

FONSECA-ALANIZ, M.; TAKADA, J.; ALONSO-VALE, M.; LIMA, F. The adipose tissue as a regulatory center of the metabolism. **Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.**, v.50, n. 2, p.216-29, 2006.

GLEZER, I.; MUNHOZ, C.; KAWAMOTO, E.; MARCOURAKIS, T.; AVELLAR, M.; SCAVONE, C. MK-801 and 7-Ni attenuate the activation of brain NF-[kappa]B induced by LPS. **Neuropharmacology**, v.45, n.8, p.1120-9, 2003.

GOMEZ-MERINO, D.; DROGOU, C.; GUEZENNEC, C.; CHENNAOUI, M. Effects of chronic exercise on cytokine production in white adipose tissue and skeletal muscle of rats. **Cytokine**, v.40, n.1, p.23-9, 2007.

GOTTSCHLING-ZELLER, H.; BIRGEL, M.; RÖHRIG, K.; HAUNER, H. Effect of tumor necrosis factor alpha and transforming growth factor beta 1 on plasminogen activator inhibitor-1 secretion from subcutaneous and omental human fat cells in suspension culture. **Metabolism**, v.49, n.5, p.666-71, 2000.

HUBE, F.; BIRGEL, M.; LEE, Y.; HAUNER, H. Expression pattern of tumour necrosis factor receptors in subcutaneous and omental human adipose tissue: role of obesity and non-insulin-dependent diabetes mellitus. **Eur. J. Clin. Invest.**, v.29, n.8, p.672-8, 1999.

INUI, A. Cancer anorexia-cachexia syndrome: are neuropeptides the key? **Cancer. Res.**, v.15, n.18, p.4493-501, 1999.

INUI, A. Feeding-related disorders in medicine, with special reference to cancer anorexia-cachexia syndrome. **Rinsho. Byori.**, v.54, n.10, p.1044-51, 2006.

ITO, Y.; NOMURA, S.; UEDA, H.; SAKURAI, T.; KIZAKI, T.; OHNO, H. Exercise training increases membrane bound form of tumor necrosis factor-alpha receptors with decreases in the secretion of soluble forms of receptors in rat adipocytes. **Life. Sci.**, v.71, p.601-609, 2002.

JUGE-AUBRY, C.; SOMM, E.; PERNIN, A.; ALIZADEH, N.; GIUSTI, V.; DAYER, J.; MEIER, CA. Adipose tissue is a regulated source of interleukin-10. **Cytokine**, v.21, n.6, p.270-4, 2005.

JUNG, S.; PARK, H.; KIM, K.; CHOI, W.; AHN, C.; KIM, B.; KIM, S.; LEE, S.; AHN, S.; KIM, Y.; KIM, H.; KIM, D.; LEE, K. Effect of weight loss on some serum cytokines in human obesity: increase in IL-10 after weight loss. **J. Nutr. Biochem.**, v.3, 2007.

KALRA, S.; DUBE, M.; PU, S.; XU, B.; HORVATH, T.; KALRA, P. Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. **Endocr. Rev.**, v.20, n.1, p.68-100, 1999.

KAZANTZIS, M.; SEELAENDER, M. Cancer cachexia modifies the zonal distribution of lipid metabolism-related proteins in rat liver. **Cell. Tissue. Res.**, v.321, n.3, p.419-27, 2005.

LIRA, F.; ROSA NETO, J.; YAMASHITA, A.; KOYAMA, C.; BATISTA, M.; SEELAENDER, M. Endurance training induces changes in il-10 and tnfr-alpha levels in rat adipose tissue. **Cytokine**, 2008. In press.

LIRA, F.; TAVARES, F.; YAMASHITA, A.; KOYAMA, C.; ALVES, M.; CAPERUTO, E.; BATISTA, M.; & SEELAENDER, M. Effect of endurance training upon lipid metabolism in the liver of cachectic tumour-bearing rats. **Cell. Biochem. Funct.**, 2008. In press.

LLOVERA, M.; GARCIA-MARTINEZ, C.; AGELL, N.; LOPEZ-SORIANO, F.; ARGILES, J. Muscle wasting associated with cancer cachexia is linked to an important activation of the ATP-dependent ubiquitin-mediated proteolysis. **Int. J. Cancer.**, v.29, n.1, p.138-41, 1995.

MACHADO, A.; COSTA ROSA, L.; SEELAENDER, M. Adipose tissue in Walker 256 tumour-induced cachexia: possible association between decreased leptin concentration and mononuclear cell infiltration. **Cell. Tissue Res.**, v.318, n.3, p.503-14, 2004.

MALEFYT, R. Interleukin-10. In: Mire-Sluis A, Thorpe R, editors. **Cytokines**. 2nd ed. Blanch Lane: Academic Press, 1999. p. 151-61.

MALLAT, Z.; BESNARD, S.; DURIEZ, M.; DELEUZE, V.; EMMANUEL, F.; BUREAU, M. Protective role of interleukin-10 in atherosclerosis. **Circ. Res.**, v.85, n.8, p.e17-24, 1999.

MARONE, M.; MOZZETTI, S.; DE RITIS, D.; PIERELLI, L. Semiquantitative RT-PCR analysis to assess the expression levels of multiple transcripts from the same sample. **Biol. Proced. Online.**, v.3, p.19-25, 2001.

MARTIGNONI, M.; KUNZE, P.; FRIESS, H. Cancer cachexia. **Mol. Cancer.**, v.5, n.2, p. 36, 2003.

MARTINS, E.; FERNANDES, L.; BARTOL, I.; CIPOLLA-NETO, J.; COSTA ROSA, L. The effect of melatonin chronic treatment upon macrophage and lymphocyte metabolism and function in Walker-256 tumour-bearing rats. **J. Neuroimmunol.**, v.82, n.1, p.81-9, 1998.

MCCARTHY, H.; MCKIBBIN, P.; PERKINS, A.; LINTON, E.; WILLIAMS, G. Alterations in hypothalamic NPY and CRF in anorexic tumor-bearing rats. **Am. J. Physiol.**, v.264, n.1, p.E638-43, 1993.

MOORE, K.; O'GARRA, A.; DE WAAL MALEFYT, R.; VIEIRA, P.; MOSMANN, T. Interleukin-10. **Annu. Rev. Immunol.**, v.11, p.165-90, 1993.

MORAES, L.; PIQUERAS, L.; BISHOP-BAILEY, D. Peroxisome proliferator-activated receptors and inflammation. **Pharmacol. Ther.**, v.110, n.3, p.371-85, 2006.

MURRAY, P. The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration. **J. Immunol.**, v.1, n.5, p.2623-9, 2007.

NARA, M.; KANDA, T.; TSUKUI, S.; INUKAI, T.; SHIMOMURA, Y.; INOUE, S.; KOBAYASHI, I. Running exercise increases tumor necrosis factor-alpha secreting from mesenteric fat in insulin-resistant rats. **Life. Sci.**, v.65, n.3, p.237-44, 1999.

NGUYEN, M.; FAVELYUKIS, S.; NGUYEN, A.; REICHART, D.; SCOTT, P.; JENN, A.; LIU-BRYAN, R.; GLASS, C.; NEELS, J.; OLEFSKY, J. A subpopulation of

macrophages infiltrates hypertrophic adipose tissue and is activated by free fatty acids via Toll-like receptors 2 and 4 and JNK-dependent pathways. **J. Biol. Chem.**, v. 30, n. 282, p. 35279-92, 2007.

NOZAKI, N.; YAMAGUCHI, S.; YAMAOKA, M.; OKUYAMA, M.; NAKAMURA, H.; TOMOIKE, H. Enhanced expression and shedding of tumor necrosis factor (TNF) receptors from mononuclear leukocytes in human heart failure. **J. Moll. Cell. Cardiol.**, v. 30, p.2003-12, 1998.

PEDERSEN, B.; FISCHER, C. Physiological roles of muscle-derived interleukin-6 in response to exercise. **Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.**, v.10, n.3, p.265-71, 2007.

PERMANA, P.; MENGE, C.; REAVEN, P. Macrophage-secreted factors induce adipocyte inflammation and insulin resistance. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.10, n.2, p. 507-14, 2006.

PERROUD, A.; ASHIMINE, R.; DE CASTRO, G.; GUIMARÃES, F.; VIEIRA, K.; APARECIDA VILELLA, C.; SAMICO CAVALCANTI, T.; DE LIMA ZOLLNER, R. Cytokine gene expression in Walker 256: a comparison of variants A (aggressive) and AR (regressive). **Cytokine**, v.36, n.3-4, p.123-33, 2006.

PETERSEN, A.; PEDERSEN, B. The anti-inflammatory effect of exercise. **J. Appl. Physiol.**, v.98, n.4, p.1154-62, 2005.

PLATA-SALAMÁN, C.; ILYIN, S.; GAYLE, D. Brain cytokine mRNAs in anorectic rats bearing prostate adenocarcinoma tumor cells. **Am. J. Physiol.**, v.275, n.2, p.R566-73, 1998.

PETERSON, J.; FEEBACK, K.; BAAS, J.; PIZZA, F. Tumor necrosis factor-alpha promotes the accumulation of neutrophils and macrophages in skeletal muscle. **J. Appl. Physiol.**, v.101, n.5, p.1394-9, 2006.

POND, C. Paracrine relationships between adipose and lymphoid tissues: implications for the mechanism of HIV-associated adipose redistribution syndrome. **Trends. Immunol.**, v. 24, n.1, p.13-18, 2003.

POND, C. Physiological specialisation of adipose tissue. **Prog. Lipid. Res.**, v.38, n.3, p. 225-48, 1999.

QUINN, L.; STRAIT-BODEY, L.; ANDERSON, B.; ARGILÉS, J.; HAVEL, P. Interleukin-15 stimulates adiponectin secretion by 3T3-L1 adipocytes: evidence for a skeletal muscle-to-fat signaling pathway. **Cell. Biol. Int.**, v.29, n.6, p.449-57, 2005.

RILEY, J.; TAKEDA, K.; AKIRA, S.; SCHREIBER, R. Interleukin-10 receptor signaling through the JAK-STAT pathway. Requirement for two distinct receptor-derived signals for anti-inflammatory action. **J. Biol. Chem.**, v.4, n.23, p.16513-21, 1999.

BLACK, R.; RAUCH, C.; KOZLOSKY, C.; PESCHON, J.; SLACK, J.; WOLFSON, M.; CASTNER, B.; STOCKING, K.; REDDY, P.; SRINIVASAN, S.; NELSON, N.; BOIANI, N.; SCHOOLEY, K.; GERHART, M.; DAVIS, R.; FITZNER, J.; JOHNSON, R.; PAXTON, R.; MARCH, C.; CERRETTI, D. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. **Nature**, v.20, n.6618, p.729-33, 1997.

ROSSI FANELLI, F.; LAVIANO, A. Cancer anorexia: a model for the understanding and treatment of secondary anorexia. **Int. J. Cardiol.**, v.85, n.1, p.67-72, 2002.

SCHOTTELIUS, A.; MAYO, M.; SARTOR, R.; BALDWIN, A. Interleukin-10 signaling blocks inhibitor of kappaB kinase activity and nuclear factor kappaB DNA binding. **J. Biol. Chem.**, v.5, n.45, p.1868-74, 1999.

SCHWARTZ, M.; BASKIN, D.; KAIYALA, K.; WOODS, S. Model for the regulation of energy balance and adiposity by the central nervous system. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.69, n.4, p.584-96, 1999.

SEELAENDER, M.; NASCIMENTO, C.; CURI, R.; WILLIAMS, J. Studies on the lipid metabolism of Walker 256 tumour-bearing rats during the development of cancer cachexia. **Biochem. Mol. Biol. Int.**, v.39, n.5, p.1037-47, 1996.

SEELAENDER, M.; CURI, R.; COLQUHOUN, A.; WILLIAMS, J.; ZAMMITT, V. Carnitine palmitoyltransferase II activity is decreased in liver mitochondria of carcinosarcoma: effect of indomethacin treatment. **Biochem. Mol. Biol. Int.**, v.44, n.1, p.185-93, 1998.

SEELAENDER, M.; KAZANTZIS, M.; COSTA ROSA, L. The effect of adrenaline and Walker-256 tumour-induced cachexia upon Kupffer cell metabolism. **Cell. Biochem. Funct.**, v.17, n.3, p.151-6, 1999.

SELEÇÃO DOS *PRIMERS*. Disponível em: <<http://www.genome.wi.mit.edu>>. Acesso em: 26 mar. 2005.

SEN, R.; BALTIMORE, D. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism. **Cell**, v.26, n.6, p.921-8, 1986.

SKURK, T.; ECKLEBE, S.; HAUNER, H. A Novel Technique to Propagate Primary Human Preadipocytes without Loss of Differentiation Capacity. **Obesity**, v.15, n.12, p.2925-31, 2007.

SLOAN, R.; SHAPIRO, P.; DEMEERSMAN, R.; MCKINLEY, P.; TRACEY, K.; SLAVOV, I.; FANG, Y.; FLOOD, P. Aerobic exercise attenuates inducible TNF production in humans. **J. Appl. Physiol.**, v.103, n.3, p.1007-11, 2007.

STEENBERG, A.; VAN HALL, G.; OSADA, T.; SACCHETTI, M.; SALTIN, B.; KLARLUND PEDERSEN, B. Production of interleukin-6 in contracting human skeletal muscles can account for the exercise-induced increase in plasma interleukin-6. **J. Physiol.**, v.15, n.529, p.237-42, 2000.

TILG, H.; DINARELLO, C.; MIER, J. IL-6 and APPs: anti-inflammatory and immunosuppressive mediators. **Immunol. Today**, v.18, n.9, p.428-32, 1997.

TISDALE, M. Wasting in cancer. **J. Nutr.**, v.129, n.1, S Suppl, p.243S-246S, 1999.

TOMAS, E.; KELLY, M.; XIANG, X.; TSAO, T.S.; KELLER, C.; KELLER, P.; LUO, Z.; LODISH, H.; SAHA, A.K.; UNGER, R.; RUDERMAN, N.B. Metabolic and hormonal interactions between muscle and adipose tissue. **Proc. Nutr. Soc.**, v.63, n.2, p.381-5, 2004.

TRAYHURN, P.; BEATTIE, J. Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. **Proc. Nutr. Soc.**, v.60, n.3, p.329-39, 2001.

TRAYHURN, P.; WOOD, I. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. **Br. J. Nutr.**, v.92, n.3, p.347-55, 2004.

TRAYHURN, P. Endocrine and signalling role of adipose tissue: new perspectives on fat. **Acta. Physiol. Scand.**, v.184, n.4, p.285-93, 2005.

WAJCHENBERG, B. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. **Endocr. Rev.**, v.21, n.6, p.697-738, 2000.

WU, D.; REN, Z.; PAE, M.; GUO, W.; CUI, X.; MERRILL, A.; MEYDANI, S. Aging up-regulates expression of inflammatory mediators in mouse adipose tissue. **J. Immunol.**, v.1, n.7, p.4829-39, 2007.

YAMAMOTO, Y.; GAYNOR, R. IkappaB kinases: key regulators of the NF-kappaB pathway. **Trends. Biochem. Sci.**, v.29, n.2, p.72-9, 2004.

YANG, A.; CHEN, H. Chronic exercise reduces adhesion molecules/iNOS expression and partially reverses vascular responsiveness in hypercholesterolemic rabbit aortae. **Atherosclerosis**, v.169, n.1, p.11-7, 2003.

YAMASHITA, A.; LIRA, F.; LIMA, W.; CARNEVALI, L.; GONÇALVES, D.; TAVARES, F.; SEELAENDER, M. Influência do treinamento físico aeróbio no transporte mitocondrial de ácidos graxos de cadeia longa no músculo esquelético: Papel do complexo carnitina palmitoil transferase. **Rev. Bras. Med. Esport.**, v.14, n.1, p.1-20, 2008.

ZHANG, Y.; PROENCA, R.; MAFFEI, M.; BARONE, M.; LEOPOLD, L.; FRIEDMAN, J. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature**, v.1, n. 6505, p.406-7, 1994.