



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

PAOLA SANCHES CELLA

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE CREATINA NA
TOXICIDADE MUSCULAR INDUZIDA PELO TRATAMENTO
COM DOXORRUBICINA EM CAMUNDONGOS C57/BL/6**

Londrina
2022

PAOLA SANCHES CELLA

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE CREATINA NA
TOXICIDADE MUSCULAR INDUZIDA PELO TRATAMENTO
COM DOXORRUBICINA EM CAMUNDONGOS C57/BL/6**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Educação Física da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Educação Física.

Orientador: Prof^o. Dr. Rafael Deminice.

Co-orientador: Prof^a. Dra. Poliana Camila Marinello

Londrina
2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Cella, Paola .

Efeito da suplementação de creatina na toxicidade muscular induzida pelo tratamento com doxorubicina em camundongos C57/BL/6 / Paola Cella. - Londrina, 2022.
86 f.

Orientador: Rafael Deminice.

Coorientador: Poliana Marinello.

Tese (Doutorado em Educação Física) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Educação Física e Esportes, Programa de Pós-Graduação em Educação Física, 2022.

Inclui bibliografia.

1. Perda de força e função muscular induzida pelo tratamento com doxorubicina - Tese. 2. Efeito da suplementação de creatina na miotoxicidade induzida pelo tratamento com doxorubicina - Tese. I. Deminice, Rafael . II. Marinello, Poliana. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Educação Física e Esportes. Programa de Pós-Graduação em Educação Física. IV. Título.

CDU 796

PAOLA SANCHES CELLA

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE CREATINA NA
TOXICIDADE MUSCULAR INDUZIDA PELO TRATAMENTO
COM DOXORRUBICINA EM CAMUNDONGOS C57/BL/6**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Educação Física da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Educação Física

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof^o. Dr. Rafael Deminice
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof^a. Dra. Ana Paula F. R. L. Bracarense
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof^a. Dra. Patrícia Chimin
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof^a Dra. Alessandra Lourenço Cecchini Armani
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof^o. Dr. José Cesar Rosa Neto
Universidade de São Paulo – USP

Londrina, 18 de julho de 2022.

AGRADECIMENTOS

Diante de tantos desafios vividos neste doutorado a tarefa de agradecer não poderia ser menos complexa. Esta conquista só foi possível devido a presença de vários artistas que auxiliaram minha chegada até esta apresentação final. Alguns vivendo dia a dia ao meu lado, outros mais distante, mas sempre contribuindo da forma que lhes cabia.

Primeiramente, gostaria de agradecer toda a confiança do meu professor orientador Dr. Rafael Deminice o qual desde meu segundo ano de faculdade me encorajou a encarar essa jornada acadêmica de pós-graduação. O qual contribuiu diretamente para meu desenvolvimento profissional e sua orientação tomou dimensões imensuráveis influenciando completamente meu desenvolvimento pessoal.

Durante meu mestrado tive a oportunidade de conhecer a professora Dra. Poliana Marinello a qual mais que uma co-orientadora foi uma amiga- irmã que me encorajou sem se quer me permitir pensar em desistir. Com todo seu conhecimento me ensinou pacientemente a realização de uma série de contas matemáticas e de muitas outras coisas sem nunca se importar de repetir inúmeras vezes.

Gostaria também de agradecer a Prof^a Dra. Patrícia Chimin por todo incentivo, ensinamento, carinho, paciência e parceria que pacientemente me ensinou muito dos manuseios com os animais e técnicas de laboratório.

Todos os colegas de laboratório que tive a honra de conhecer contribuíram para que eu chegasse até aqui, por isso, agradeço a paciência e carinho de todos, Mayra Tardelli, Camila Padilha, Jonathan Nunes, Donizette, Loriane Godinho, Tatiana Azevedo, Beatriz, Phillippe Guirro, Diogo Ribeiro, Ícaro Búçu e Guilherme Dantas.

Deixo aqui um agradecimento para todos os meus professores da graduação, os quais continuaram me acompanhando e auxiliando durante minha pós-graduação, em especial ao professor Felipe Moura que contribuiu com análises deste estudo e a todos os funcionários da Universidade Estadual de Londrina que sempre me socorreram quando necessário.

Outras pessoas que tenho imenso prazer em destacar aqui são meus amigos e colegas que me auxiliam de outras formas que não diretamente relacionada a pesquisa. Destaco aqui toda a Cia Circo Voador, diretamente de Araçatuba-SP, a qual mesmo distante continuamos próximas nos ajudando, trocando risadas e experiencias, um verdadeiro pilar de amizade que contribuiu para sustentar diversas dificuldades, a equipe do Zirkus Espaço Cultural, em especial Lucas Hilário e Adriano Saul que sempre acolheram e permitiram que eu continuasse a prática circense; a Entrepassos cia de dança, em especial Prof. Paulo Ricardo e Lucília Utiyama que me ensinaram muito sobre dança e sempre me acolheram; ao melhor time de futebol feminino de Londrina, Talendo_Fc, com um agradecimento especial a fundadora Thayane Castanho e uma enorme gratidão por todas que tão bem me acolheram. Ao Paulo Ricardo Medeiros, Laísia Camila e seus respectivos familiares que me acolheram como membro da família desde a graduação. Aos colegas e amigos Érica Boregio, Cristiana Greggio, Maisa Inoe, Bruna Almeida, Júlio Costa, Arnaldo Junior, Natália Medeiros, Violeta Braga, Douglas Sironi, Camila Guarnieri, Thamara Batista, Diogo Castro, Marcos e Roberta Fecchio, Ricardo e Andressa Matos que me proporcionaram bons momentos com boas conversas, distrações e risadas.

Um agradecimento a todos os membros da minha família, tios, padrinhos, primas que sempre apoiaram e acreditaram no meu potencial em especial aos meus avós, meus pais, Paulo e Aralicia Cella e meu irmão Matheus Cella onde não existem palavras para corresponder tamanha gratidão; nunca mediram esforços para fazer acontecer e sem eles, com certeza, não teria chegado até aqui.

Por fim, agradeço a banca por ter aceitado o convite e se disponibilizado a participar da minha defesa de forma a contribuir com minha formação como doutora com seus conhecimentos e posicionamentos.

CELLA, Paola Sanches. **Efeito da suplementação de creatina na toxicidade muscular induzida pelo tratamento com doxorubicina em camundongos C57/BL/6**. 2022. 86 f. Tese de doutorado (Programa de Pós-Graduação em Educação Física) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

RESUMO

Introdução: A doxorubicina (DOX) é um quimioterápico muito utilizado no tratamento de diversos tipos de câncer. Devido a um aumento na produção de radicais livres a DOX induz miotoxicidade prejudicando a qualidade de vida dos pacientes. Sabendo dos efeitos pleotrópicos da suplementação de creatina no músculo esquelético, o presente estudo tem como objetivo de 1) estudar a miotoxicidade induzida por ciclos de tratamento com DOX e sua capacidade de promover perda de força, massa muscular e função física, parâmetros definidores da sarcopenia e fragilidade em camundongos e; 2) estudar os efeitos da suplementação de creatina sobre esses parâmetros de miotoxicidade induzida pelo tratamento com ciclos de DOX em camundongos. **Metodologia:** Foram realizados 3 experimentos. Experimento 1- objetivo foi desenvolver um modelo de tratamento de DOX em ciclos, compatível com o tratamento oncológico, útil para estudo de miotoxicidade: camundongos foram expostos a 4 diferentes regimes de tratamento com DOX (16 a 24mg/kg por 10 a 20 dias). Experimento 2- analisar o efeito do tratamento com DOX sobre os principais parâmetros da sarcopenia e fragilidade- perda de força, atrofia muscular e perda de função- em camundongos expostos a 18 mg/kg fracionados em 15 dias. Experimento 3- analisar os efeitos da suplementação de creatina na ração (4%) sobre a perda de força, atrofia e função muscular promovidos pelo tratamento com DOX em camundongos expostos a 16 mg/kg fracionados em 20 dias. **Resultados** O tratamento com DOX promoveu redução da força 20% ($P<0,05$) a partir do décimo dia e atrofia muscular, distúrbios compatíveis com a sarcopenia e induziu um escore de fragilidade moderado ($P<0,05$). A suplementação de creatina modulou a perda de força promovida pela DOX, amenizou a atrofia dos músculos EDL e sóleo, reduziu os níveis de IL-6 (interleucina-6), reduziu a depleção linfóide esplênica retardou a redução do folículo do baço, mas não alterou o escore de fragilidade. **Conclusões:** O tratamento com DOX promoveu perda de força, função muscular e atrofia, principais definidores da sarcopenia e fragilidade. A suplementação de creatina pode ser uma estratégia para auxiliar a amenizar a perda de força promovida pela DOX.

Palavras-chave: antraciclina; atrofia; perda de função; creatina

CELLA, Paola Sanches. **Creatine supplementation on doxorubicin-induced muscle toxicity in C57/BL/6 mice: effect of creatine supplementation.** 2022. 86 p. Doctoral thesis (Postgraduate Program in Physical Education) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

ABSTRACT

Introduction: Doxorubicin (DOX) is a chemotherapy drug widely used in the treatment of various types of cancer. Due to an increase in free radicals production, DOX induces myotoxicity, impairing the quality of life of patients. Knowing the pleiotropic effects of creatine supplementation on skeletal muscle, the present study aims to 1) study the myotoxicity induced by DOX treatment cycles and its ability to promote loss of strength, muscle mass and physical function, defining parameters of sarcopenia and frailty in mice; 2) to study the effects of creatine supplementation on these parameters of myotoxicity induced by treatment with DOX cycles in mice. **Methods:** Experiment 1- objective was to develop a cycled DOX treatment model, compatible with cancer treatment, useful for myotoxicity study: mice were exposed to 4 different DOX treatment regimens (16 to 24mg/kg for 10 to 20 days). Experiment 2- analyze the effect of DOX treatment on the main parameters of sarcopenia and frailty- strength loss, muscle atrophy and loss of function- in mice exposed to 18 mg/kg fractionated in 15 days. Experiment 3- to analyze the effects of creatine supplementation in the diet (4%) on strength loss, atrophy and muscle function promoted by DOX treatment in mice exposed to 16 mg/kg fractionated in 20 days. **Results:** DOX treatment promoted a 20% strength reduction ($P<0.05$) from the tenth day and muscle atrophy, disorders compatible with sarcopenia and presented a moderate frailty score ($P<0.05$). Creatine supplementation modulated strength loss promoted by DOX, ameliorated EDL and soleus atrophy, reduced IL-6 levels, reduced splenic lymphoid depletion, but did not change the frailty score. **Conclusions:** DOX treatment promoted strength loss, muscle function and atrophy, the main determinants of sarcopenia and frailty. Creatine supplementation may be a strategy to help alleviate of strength loss promoted by DOX.

Key words: anthracyclines; atrophy; function loss; creatine.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Mecanismos de miotoxicidade induzidos pelo tratamento com doxorubicina.23
- Figura 2** – Efeito da suplementação de creatina no estresse oxidativo. ATP: adenosina-trifosfato; CK: creatina quinase; EO: estresse oxidativo; ERO: espécies reativas de oxigênio; PCr: fosfocreatina; H₂O₂: peróxido de hidrogênio. Fonte. Adaptado e traduzido de Arazi, Eghbali, Suzuki, (2021).31
- Figura 3** – Delineamento experimental 1. Dox-10d (24mg/kg): 4 doses intraperitoneais de doxorubicina na concentração de 6mg/kg em dias alternados durante 10 dias, totalizando 24mg/kg; Dox-15d (24mg/kg): 4 doses na concentração de 6mg/kg a cada 4 dias durante 15 dias, totalizando 24mg/kg; Dox-15d (18mg/kg): 3 doses concentração de 6mg/kg a cada 5 dias durante 15 dias, totalizando 18mg/kg; Dox-20d (16mg/kg): concentração de 4mg/kg a cada 5 dias durante 20 dias, totalizando 16mg/kg; d: dias.34
- Figura 4** – Delineamento Experimental 2. 1RM: uma repetição máxima, análise do ganho de força muscular; d: dias; Grip teste: Grip strength teste, análise da força muscular de tração.35
- Figura 5** – Delineamento experimental 3 1RM: uma repetição máxima para análise do ganho de força muscular; d: dias; Grip teste: *Grip strength* teste para análise da força muscular de tração.36
- Figura 6** – Testes de força muscular A) Aparelho para avaliação da tração muscular para análise da progressão muscular pelo teste *Grip strength Meter*; B) Escada do teste de uma repetição máxima (1RM).37
- Figura 7** – Quantificação da área de secção transversa (AST) e deposição de colágeno pelo programa Image J.40
- Figura 8** – A) Progressão do peso corporal dos animais e Figura B) Curva de sobrevivência dos animais. Dox- 10d (n=6): concentração de 6mg/kg em dias alternados durante 10 dias (dose acumulativa de 24mg/kg); Dox-15d: concentração de 6mg/kg a cada 4 dias durante 15 dias (dose acumulativa de 24mg/kg); Dox 15d- 3 doses: concentração de 6mg/kg a cada 5 dias durante 15 dias (dose acumulativa de 18mg/kg); Dox-20d:

- concentração de 4mg/kg a cada 5 dias durante 20 dias (dose acumulativa de 16mg/kg).....44
- Figura 9** – Parâmetros de força muscular. A) Ganho de força no Teste de 1RM (uma repetição máxima) na escada B) Progressão do ganho de força pelo teste *Grip strength meter*. Valores estão apresentados em média e desvio padrão. O símbolo * indicia diferença estatística ($P < 0,05$) do grupo Dox para o grupo C (gráfico A: test-t não pareado; gráfico B: ANOVA two- way). C: grupo controle Dox: grupo tratado com 3 injeções i.p de 6mg/kg de doxorubicina a cada 5 dias durante 15 dias (dose acumulativa de 18 mg/kg).46
- Figura 10** – Análise da atrofia muscular promovido pelo tratamento com doxorubicina- coloração hematoxilina e eosina (A) Diâmetro dos cardiomiócitos e Área de secção transversa dos músculos (B) diafragma, (C) gastrocnêmio, (D) sóleo e (E) EDL (extensor longo dos dedos). F) Fotos representativas. Valores estão apresentados em mediana e interquartis. O símbolo * indicia diferença estatística ($P < 0,05$) do grupo Dox para o grupo C (por Wilcoxon signed- rank test). AST: área de secção transversa; EDL- extenso longo dos dedos; C: grupo controle Dox: grupo tratado com 3 injeções i.p de 6mg/kg de doxorubicina a cada 5 dias durante 15 dias (dose acumulativa de 18 mg/kg).48
- Figura 11** – Tratamento com doxorubicina promove aumento do escore de Fragilidade.....48
- Figura 12** – Correlação entre escore de fragilidade e ganho de força muscular do teste de escalada (A) e área de secção transversa (AST) do gastrocnêmio (B).49
- Figura 13** – Progressão de peso corporal dos animais. Valores apresentados em média e desvio padrão (C -n=9; Dox e Dox Cr n=10). \$ Diferença dos grupos Dox e DoxCr em relação ao grupo C do dia 6 até o dia 20 ($P < 0,05$). C: grupo controle; Dox: grupo tratado com 4 injeções intraperitoneais de 4mg/kg de doxorubicina a cada 5 dias (dose acumulativa de 16 mg/kg); DoxCr: grupo tratado com 4 injeções intraperitoneais de 4mg/kg de doxorubicina a cada 5 dias (dose acumulativa de 16 mg/kg) e suplementado com creatina na ração (4%).50

Figura 14 – Área de secção transversa dos músculos A) EDL (extensor longo dos dedos) B) Sóleo C) Diafragma e D) Gastrocnêmio; Fotos representativas E) EDL, F) Sóleo, G) Diafragma e H) Gastrocnêmio. Dados apresentado em mediana e intervalos interquartis. *Diferença dos grupos em relação ao grupo C; # Diferença dos grupos em relação ao grupo Dox ($P < 0,05$). AST: área de secção transversa; C: grupo controle; Dox: grupo tratado com 4 injeções intraperitoneais de 4mg/kg de doxorubicina a cada 5 dias (dose acumulativa de 16 mg/kg); DoxCr: grupo tratado com 4 injeções intraperitoneais de 4mg/kg de doxorubicina a cada 5 dias (dose acumulativa de 16 mg/kg) e suplementado com creatina na ração.....53

Figura 15 – Parâmetros de fragilidade e de força muscular. (A) escore de fragilidade calculado pelas variáveis quantificadas pelo teste de campo aberto. B) Grip strenght meter e C) Teste de 1RM realizado na escada. Valores apresentados em média e desvio padrão. *Diferença dos grupos em relação ao grupo C ($P < 0,05$). # Diferença dos grupos em relação ao grupo Dox. C: grupo controle; Dox: grupo tratado com 4 injeções intraperitoneais de 4mg/kg de doxorubicina a cada 5 dias (dose acumulativa de 16 mg/kg); DoxCr: grupo tratado com 4 injeções intraperitoneais de 4mg/kg de doxorubicina a cada 5 dias (dose acumulativa de 16 mg/kg) e suplementado com creatina na ração; RM: repetição máxima.54

Figura 16 – Concentração de citocinas no músculo gastrocnêmio A) TNF-alfa, B) IL-6 e marcadores de estresse oxidativo C) MDA, D) GSH, E) GSSG e F) GSH/GSSG. *Diferença dos grupos em relação ao grupo C; # Diferença dos grupos em relação ao grupo Dox ($P < 0,05$). C: grupo controle; Dox: grupo tratado com 4 injeções intraperitoneais de 4mg/kg de doxorubicina a cada 5 dias (dose acumulativa de 16 mg/kg); DoxCr: grupo tratado com 4 injeções intraperitoneais de 4mg/kg de doxorubicina a cada 5 dias (dose acumulativa de 16 mg/kg) e suplementado com creatina na ração.....56

Figura 17 – Parâmetros de caquexia espleno-cardíaca. A) Peso do coração corrigido pelo comprimento da tíbia B) Deposição de colágeno nos cardiomiócitos marcado pela coloração tricrômico de Masson; C) Peso

do baço corrigido pelo comprimento da tibia; D) Tamanho dos folículos marcado pela coloração com Hemataxilina e eosina. Valores apresentados em média e desvio padrão. *Diferença dos grupos em relação ao grupo C ($P < 0,05$). C: grupo controle; Dox: grupo tratado com 4 injeções intraperitoneais de 4mg/kg de doxorubicina a cada 5 dias (dose acumulativa de 16 mg/kg); DoxCr: grupo tratado com 4 injeções intraperitoneais de 4mg/kg de doxorubicina a cada 5 dias (dose acumulativa de 16 mg/kg) e suplementado com creatina na ração.57

Figura 18 – Concentração de citocinas no coração A) TNF-alfa, B) IL-6 e marcadores de estresse oxidativo C) MDA, D) GSH, E) GSSG e F) GSH/GSSG. *Diferença dos grupos em relação ao grupo C; # Diferença dos grupos em relação ao grupo Dox ($P < 0,05$). C: grupo controle; Dox: grupo tratado com 4 injeções intraperitoneais de 4mg/kg de doxorubicina a cada 5 dias (dose acumulativa de 16 mg/kg); DoxCr: grupo tratado com 4 injeções intraperitoneais de 4mg/kg de doxorubicina a cada 5 dias (dose acumulativa de 16 mg/kg) e suplementado com creatina na ração. MDA: malondialdeído. GSH: glutatona; GSSG: glutatona dissulfeto.....59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características Gerais	45
Tabela 2 – Parâmetros para análise do score de fragilidade.....	49
Tabela 3 – Características Gerais	51

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

ADP	Difosfato de adenosina
ATP	Adenosina-trifosfato
AST	Área de secção transversa
Atrogin	<i>Fbxo32- muscle atrophy F-box</i>
Bax	<i>BLC-2 associated protein X</i>
BLC-2	<i>Cell lymphoma protein 2</i>
C	Grupos que receberam injeções com soluções salinas
CEFE	Centro de Educação física
CEUA	Comissão de Ética na Utilização de Animais
COX	Ciclooxigenase
DHA	Docosahexaenóico
DOX	Doxorrubicina
Dox	Grupos tratados com doxorrubicina
DoxCr	Grupos tratados com doxorrubicina e suplementação de creatina
DXA	Absortometria de raio-x de dupla energia
EDL	Extensor longo dos dedos
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FOXO	<i>Forkhead box O</i>
GSH	Glutationa
GSSG	Glutationa reduzida
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IGF-1	<i>Insulin-like growth fator-1</i>
i.p	Intraperitoneal
LC3	<i>Microtubule-associated proteins 1A/B light chain 3</i>
LOX	Lipooxigenase
LPS	Indutor de citocinas
mTOR	<i>Mammalian target of the rapamycin</i>
Murf	<i>Muscle ring finger-1</i>
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo desidrogense
PCr	Fosfocreatina
PGC-1 α/β	Proliferador de peroxissoma 1 α/β
SPPB	<i>Short physical performance battery</i>

RM

Repetição máxima

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	17
2.	JUSTIFICATIVA	19
3.	OBJETIVOS	21
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
4.	REVISÃO DE LITERATURA	22
4.1	DOXORRUBICINA E TOXICIDADE MUSCULAR	22
4.2	DOXORRUBICINA, SARCOPENIA E FRAGILIDADE	26
4.3	SUPLEMENTAÇÃO DE CREATINA	28
5.	METODOLOGIA	33
5.1	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	33
5.2	EXPERIMENTO 1	33
5.3	EXPERIMENTO 2	34
5.4	EXPERIMENTO 3	35
5.5	DETERMINAÇÃO DA FORÇA, FUNÇÃO FÍSICA E FRAGILIDADE FUNCIONAL	36
5.6	EUTANÁSIA E PREPARAÇÃO DOS TECIDOS	38
5.7	HISTOLOGIA	39
5.8	ANÁLISES BIOQUÍMICAS	41
5.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA	41
6	RESULTADOS	43
7	DISCUSSÃO	60
8	LIMITAÇÕES	67
9	CONCLUSÕES	68
	REFERÊNCIAS	69
	APÊNDICE	85
	APÊNDICE A	86

1. INTRODUÇÃO

A quimioterapia é uma estratégia farmacológica importante para a cura do câncer ou melhora da sobrevida e qualidade de vida dos pacientes. Segundo a Sociedade Americana de Câncer, em 2016 mais de 15,5 milhões de crianças e adultos com histórico de câncer estavam vivos nos EUA devido as diferentes formas de tratamento contra o câncer, como a cirurgia, quimioterapia, terapia hormonal, terapia imunológica e radioterapia (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016; MARKMAN; MARKMAN, 2019). De fato, o número de sobreviventes de todos os tipos de câncer aumentou consideravelmente nos últimos anos, de aproximadamente 3,8 milhões em 1975 para 15,5 milhões em 2016 e com perspectiva de aumentar para 18 milhões até 2022 (DE MOOR *et al.*, 2013). Os sobreviventes de câncer de mama são a maior parcela desse total com 22% ou aproximadamente 3 milhões de sobreviventes em 2012 (JANET *et al.*, 2013).

As antraciclinas correspondem a uma das classes mais utilizadas de quimioterápicos e trata diversos tipos de câncer (MCGOWAN *et al.*, 2017). Cerca de 32% dos pacientes com câncer de mama e aproximadamente 60% dos pacientes que sobrevivem ao câncer são tratados com alguma antraciclina (MCGOWAN *et al.*, 2017). É um dos fármacos antineoplásicos mais potentes no mercado, muito utilizada sozinha ou acompanhada de outros medicamentos. Há mais de quarenta anos no combate a leucemias e tumores sólidos (CARVALHO *et al.*, 2009; MADKOUR, 2019).

A doxorrubicina é um antibiótico antitumoral isolado de cepas de *Streptomyces* spp., capaz de induzir a morte celular e/ou interferir nas fases do crescimento celular através de vários mecanismos moleculares como a inibição da topoisomerase II, bloqueio da síntese de DNA (ácido desoxirribonucleico) e RNA (ácido ribonucleico) intercalando-se entre os pares de base ou pela produção de radicais livres (CHEN, C. *et al.*, 2018; LU, 2005).

Os mecanismos pelos quais a doxorrubicina age não são específicos para as células tumorais. O quimioterápico afeta células com alta proliferação celular como por exemplo, as células tumorais, células da medula óssea, células intestinais, cabelo, assim como também afeta o músculo cardíaco e esquelético o que resulta em uma série de efeitos colaterais como perda de cabelo, perda de apetite, morte das células da medula óssea, miotoxicidade entre outros (CARVALHO *et al.*, 2009; DENARD; LEE; YE, 2012; KWON, 2020; SONGBO *et al.*, 2019; TARPEY *et al.*, 2019). A toxicidade muscular promovida pela doxorrubicina

1 geralmente prejudica a qualidade de vida dos pacientes, apresentado como aumento da fadiga
2 e da fraqueza- principais sinais de sarcopenia- o que muitas vezes pode retardar o tratamento
3 e até mesmo ser letal para os pacientes (VALIYIL; CHRISTOPHER-STINE, 2010). Estudos
4 têm mostrado que, de forma geral, pacientes com câncer e sarcopênicos sobrevivem menos do
5 que pacientes que não desenvolvem sarcopenia (ANJANAPPA *et al.*, 2020; HUANG *et al.*,
6 2017; TAN *et al.*, 2015).

7 Dessa forma compreender as alterações sobre os principais moderadores de sarcopenia
8 (perda de força, função e atrofia muscular) pode auxiliar a desenvolver estratégias de
9 intervenção para amenizar os efeitos colaterais causados pelo tratamento com doxorrubicina.
10 Uma das alternativas descritas na literatura para retardar os efeitos da sarcopenia é o uso da
11 suplementação de creatina principalmente devido seus efeitos energéticos e antioxidantes
12 (GUESCINI *et al.*, 2017; KREIDER *et al.*, 2017).

1 2. JUSTIFICATIVA

2 A doxorubicina é uma antraciclina amplamente utilizada no tratamento de diversos
3 tipos de câncer. Entretanto, ao mesmo tempo que atua sobre as células tumorais a
4 doxorubicina atinge células saudáveis do coração, músculo esquelético e outros tecidos,
5 causando efeitos colaterais que comprometem fisicamente o indivíduo através de alterações
6 vasomotoras, depressão, fadiga e perda de força que podem se manifestar tanto a curto quanto
7 a longo prazo prejudicando a qualidade de vida dos pacientes (GANZ *et al.*, 2008). Os
8 principais mecanismos relacionados a alta toxicidade muscular promovida pela doxorubicina
9 estão associados ao aumento da geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) e indução de
10 estresse oxidativo provocados pela metabolização da doxorubicina que provocam a ativação
11 de vias proteolíticas (KWON, 2020; SMUDER *et al.*, 2011).

12 Estudos prévios demonstram que o tratamento com alguns quimioterápicos (taxanos,
13 poliquimioterapia, capecitabine, epirubicina, cisplatina entre outros) promovem sarcopenia
14 (BOZZETTI, 2020). Uma vez que o paciente apresente sarcopenia, o tratamento se torna
15 menos efetivo, mais tóxico para o organismo, sendo necessário, muitas vezes, sua interrupção
16 (BOZZETTI, 2020). Uma das explicações para uma maior toxicidade em pacientes
17 sarcopênicos é dada pela variação farmacocinética da droga, a qual utiliza a área de superfície
18 corporal dos pacientes para cálculo da dose, assim, pacientes com baixa massa corporal magra
19 tem baixo volume de distribuição de droga, e por outro lado estados pró-inflamatórios podem
20 levar um aumento da exposição sistêmica de drogas citotóxicas (ANJANAPPA *et al.*, 2020;
21 PRADO *et al.*, 2011).

22 Sabendo que o diagnóstico da sarcopenia pode ser um dos definidores da continuidade
23 ou interrupção do tratamento quimioterápico, além de ser um forte indicativo de sobrevida,
24 fica clara a importância de avaliar se o tratamento com doxorubicina induz sarcopenia.
25 Apesar de haver estudos analisando a toxicidade da doxorubicina no músculo esquelético e
26 cardíaco, pouco se sabe sobre os efeitos desta droga na perda de força e de função física. Por
27 essa razão, torna-se necessário estudar os efeitos da doxorubicina sobre os principais
28 componentes da sarcopenia e fragilidade funcional, com finalidade de buscar estratégias
29 terapêuticas que amenizem esses distúrbios.

30 Dados da literatura são expressivos em relação a cardiotoxicidade e miotoxicidade
31 induzidos pela doxorubicina, no entanto, a maioria dos estudos utiliza administração única
32 com doses elevadas de doxorubicina como forma de induzir a toxicidade (BREDAHL *et al.*,

1 2016; GILLIAM *et al.*, 2011a; GILLIAM; ST. CLAIR, 2011; HAYWARD *et al.*, 2013;
2 KAVAZIS; SMUDER; POWERS, 2014; LIU, J. *et al.*, 2019; QUINN; HYDOCK, 2017;
3 SMUDER *et al.*, 2011; YU *et al.*, 2014), o que difere do tratamento quimioterápico realizado
4 em pacientes oncológicos. O tratamento quimioterápico é geralmente realizado em ciclos,
5 permitindo que o paciente tenha um tempo de recuperação entre uma dose e outra (D'LUGOS
6 *et al.*, 2019; DE LIMA *et al.*, 2016; HUANG *et al.*, 2017; HULMI *et al.*, 2018; NISSINEN *et*
7 *al.*, 2016). Assim, é importante desenvolver modelo pré-clínico que se aproxime do
8 tratamento quimioterápico em humanos e que seja compatível com o estudo de miopatias.

9 A creatina tem sido testada com sucesso em situações que causam miopatias, devido
10 às suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e anti-atróficas em doenças que
11 promovem perda de massa muscular, como o câncer, através da amenização da perda de
12 massa muscular e da força (CAMPOS-FERRAZ *et al.*, 2014, 2016; CELLA *et al.*, 2019;
13 DEMINICE *et al.*, 2016; GUALANO *et al.*, 2012; HARMON *et al.*, 2021; HESPEL *et al.*,
14 2001; JOHNSTON *et al.*, 2009; MARZUCA-NASSR *et al.*, 2019; SAKKAS;
15 SCHAMBELAN; MULLIGAN, 2009). Apesar do efeito energético da suplementação de
16 creatina no músculo esquelético, um estudo conduzido em ratos demonstrou que esta não é
17 capaz de fornecer energia para o tecido tumoral num modelo de Walker-256, uma vez que o
18 tumor fosse capaz de utilizar a creatina como fonte de energia, isto poderia resultar em
19 tumores mais agressivos (CELLA *et al.*, 2020) .

20 No entanto, pouco se sabe sobre os efeitos da suplementação de creatina sobre a
21 toxicidade cardíaca e muscular induzida pela doxorrubicina. Considerando os resultados
22 anteriores, nossa hipótese é que a suplementação com creatina possa diminuir a toxicidade da
23 doxorrubicina promovida pelo aumento de ERO e pela ativação de vias de degradação de
24 proteínas e atrofia muscular e como consequência amenizar perda de massa e função
25 muscular.

1 **3. OBJETIVOS**

2 Os objetivos principais do presente estudo são 1) determinar o efeito da doxorubicina
3 sobre os principais moderadores da sarcopenia: perda de força, massa muscular e disfunções
4 físicas; e 2) analisar efeito da suplementação de creatina sobre a toxicidade e atrofia muscular
5 cardíaca e esquelética induzida pela doxorubicina.

6 3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

7 1) Desenvolver modelo pré-clínico de tratamento com doxorubicina em ciclos, compatível
8 com o tratamento de pacientes oncológicos, que seja útil para estudo de miopatias em
9 camundongos.

10 2) Determinar o efeito do tratamento em ciclos com doxorubicina sobre os principais
11 moderadores da sarcopenia em camundongos: perda de massa e força musculares e
12 disfunções físicas.

13 3) Analisar o efeito da suplementação de creatina sobre a toxicidade muscular promovida
14 pelo tratamento em ciclos com doxorubicina.

15

16

1 4. REVISÃO DE LITERATURA

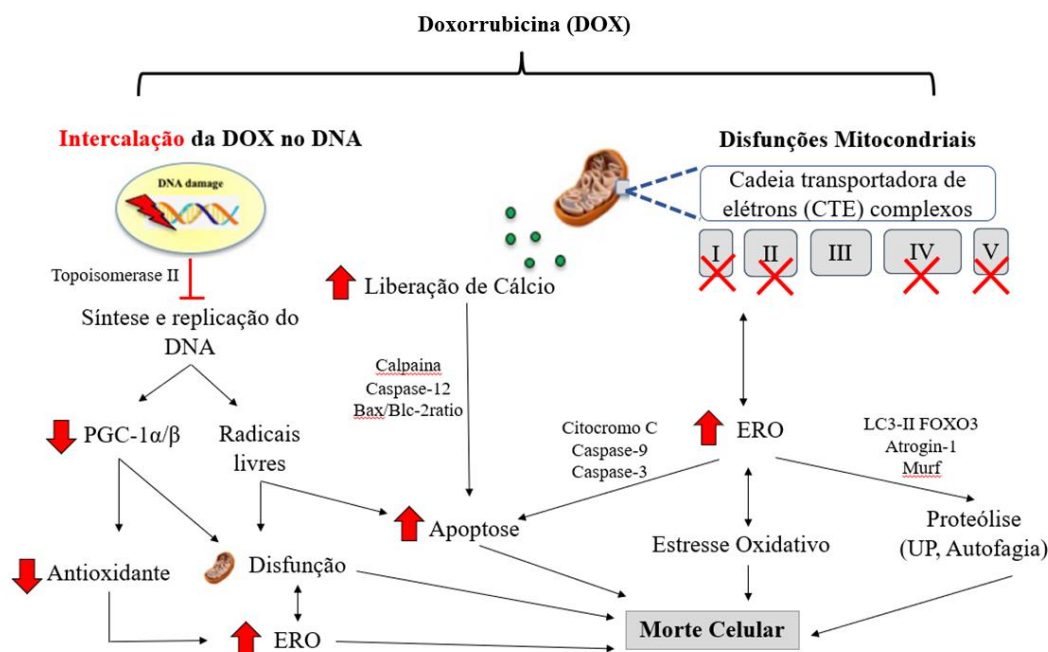
2 4.1 DOXORRUBICINA E TOXICIDADE MUSCULAR

3 A perda de massa muscular influencia na resposta ao tratamento do câncer. Pacientes
4 que apresentam perda de massa muscular possuem pior prognóstico e aumento da toxicidade
5 induzida pelo quimioterápico (HIENSCH *et al.*, 2020). A manutenção da massa muscular
6 normalmente implica numa melhor resposta ao tratamento e aumento da sobrevida do
7 paciente (HIENSCH *et al.*, 2020).

8 Entretanto, já se sabe que um dos efeitos colaterais da doxorubicina é a miotoxicidade
9 que está relacionada a um aumento do estresse oxidativo causando atrofia do músculo
10 esquelético e cardíaco (KWON, 2020; NESAKUMAR *et al.*, 2018; TARPEY *et al.*, 2019).
11 Um adulto normal perde cerca de 1.3% de massa muscular por ano, enquanto pacientes
12 submetidos ao tratamento com diferentes tipos de quimioterápico (taxanos, poliquimioterapia,
13 capecitabina, epirrubicina, cisplatina entre outros) apresentam perda de 6,2% a cada 100 dias
14 (BOZZETTI, 2020). Uma vez que essa perda de massa muscular afeta exacerbadamente a
15 vida do paciente é provável que o tratamento seja interrompido ou postergado (RAUSCH *et*
16 *al.*, 2021).

17 Um dos motivos pelo qual o tratamento com doxorubicina induz miotoxicidade, é o
18 acúmulo de doxorubicina e do seu metabólito doxorubicinol no tecido muscular que persiste
19 mesmo após o término do tratamento (GOUSPILLOU *et al.*, 2015; TARPEY *et al.*, 2019). A
20 ação anticâncer da doxorubicina ocorre principalmente através da sua estrutura molecular em
21 quinona, a qual é oxidada e através de uma reação reversível forma um metabólito instável, a
22 semiquinona (THORN *et al.*, 2011; ZHU *et al.*, 2016). Essas estruturas quinonas apresentam
23 interesse toxicológico e farmacológico consideráveis devido sua habilidade de formar ERO
24 (BOLTON; DUNLAP, 2017). A quinona altera a conformação da estrutura molecular da
25 doxorubicina auxiliando a ligação da doxorubicina na molécula de DNA (DI *et al.*, 2020).
26 Assim, cada vez que a quinona altera a conformação da estrutura molecular da doxorubicina
27 há a formação de radicais livres que podem interagir com o oxigênio e formar ERO (DI *et al.*,
28 2020; THORN *et al.*, 2011). A Figura 1 apresenta um resumo dos mecanismos pelos quais a
29 doxorubicina induz miotoxicidade. Uma vez que a doxorubicina consegue se intercalar no
30 DNA ela diminui a atividade da enzima topoisomerase II, enzima essa responsável pelo
31 processo de replicação do DNA e altamente expressa em células cancerígenas, além de causar
32 danos irreparáveis no DNA (SONGBO *et al.*, 2019). Os mesmos mecanismos que eliminam

1 as células tumorais (aumento de ERO) e os mecanismos que inibem o desenvolvimento do
 2 tumor (inibição da topoisomerase II) são também responsáveis por induzir miotoxicidade
 3 (ZHU *et al.*, 2016).



4

5 **Figura 1-** Mecanismos de miotoxicidade induzidos pelo tratamento com doxorrubicina.

6 Bax: *BLC-2 associated protein X*; BCL-2: *Cell lymphoma protein 2*; DOX: doxorrubicina;
 7 DNA: ácido desoxirribonucleico; ERO: espécies reativas de oxigênio; FOXO3 *forkhead box*
 8 *O3*; LC3-II: *microtubule-associated proteins 1A/B light chain 3B-II*; PGC-1 α/β : proliferador
 9 de peroxissoma 1 α/β . Fonte: adaptado e traduzido de Kwon, (2020).

10 Outra forma que o tratamento com doxorrubicina promove miotoxicidade é a inibição
 11 de proteínas de biogênese mitocondrial (como por exemplo, PGC1- α : proliferador de
 12 peroxissoma 1- α), resultando em disfunções mitocondriais, como por exemplo: 1) liberação
 13 exacerbada de cálcio na célula, o que altera a permeabilidade de membrana causando a
 14 liberação do citocromo c (proteína importante para ativação das caspases e ativação da
 15 apoptose celular); 2) lesões nos complexos da cadeia transportadora de elétrons as quais
 16 prejudicam a capacidade antioxidante da célula promovendo formação excessiva de radicais
 17 livres e ERO. Essas alterações comprometem todo o metabolismo energético celular
 18 (GUVEN; SEVGILER, 2018; KWON, 2020).

19 A afinidade da doxorrubicina pela membrana interna da mitocôndria em conjunto com
 20 essas disfunções mitocondriais causadas pelo tratamento com doxorrubicina promovem um
 21 aumento ainda maior da produção de ERO, pois facilita que a doxorrubicina seja reduzida

1 pelo NADH (nicotinamida adenina dinucleotídeo desidrogenase) resultando na formação de
2 superóxido e levando a célula a um estado de estresse oxidativo com consequente ativação de
3 proteínas chaves dos mecanismos de proteólise, como por exemplo proteínas do sistema de
4 autofagia (LC3: *microtubule-associated proteins 1A/B light chain 3B*; e Beclin) e do sistema
5 ubiquitina-proteassoma (Murf: *muscle ring finger-1*; atrogin-1: *Fbxo32- muscle atrophy F-*
6 *box* e FOXO: *forkhead box O*) até que ocorra a morte celular (DOERR *et al.*, 2020; KWON,
7 2020; SMUDER *et al.*, 2013; TARPEY *et al.*, 2019).

8 O processo de autofagia é um processo autodestrutivo, o qual se inicia com a formação
9 dos fagóforos envolvendo a organela/proteína danificada com o auxílio da proteína Beclin-1 e
10 LC3 (DOS SANTOS *et al.*, 2016). A proteína Beclin-1 está relacionada com o início do
11 processo de autofagia, iniciando a formação da membrana de isolamento do autofagossomo,
12 enquanto a LC3 auxilia o alongamento e fechamento do autofagossomo (SMUDER *et al.*,
13 2013). O autofagossomo fornece uma segunda membrana para envolver completamente a
14 organela que será degradada (SMUDER *et al.*, 2013). O próximo passo da autofagia é a fusão
15 do autofagossomo com o lisossomo para degradar a organela envolvida com a liberação de
16 proteases lisossomais (DOS SANTOS *et al.*, 2016). O tratamento com dose única de
17 doxorrubicina em animais saudáveis (20mg/kg do peso corporal i.p) 24h antes da morte dos
18 animais promoveu aumento da sinalização da autofagia nos cardiomiócitos caracterizado pelo
19 aumento de proteínas chaves como por exemplo, Beclin-1 e LC3 (SMUDER *et al.*, 2013).

20 Em outro estudo, a mesma concentração de doxorrubicina (20mg/kg do peso corporal
21 i.p.) em animais saudáveis ativou a via de sinalização da FoxO, que interage com genes
22 relacionados com atrofia muscular e promoveu redução de aproximadamente 20% na área de
23 secção transversa do músculo plantar e de ~36% no diafragma, além de reduzir em ~35% a
24 força diafragmática (KAVAZIS; SMUDER; POWERS, 2014; MIN *et al.*, 2015). Ao
25 submeter os animais ao tratamento com ciclos de doxorrubicina (2,5 mg/kg de peso corporal,
26 i.p.; duas vezes por semana por 42 dias) foi encontrado atrofia muscular no músculo
27 gastrocnêmio de ~50% (DE LIMA *et al.*, 2016). Essa atrofia está relacionada com a
28 desforilação da FoxO e sua consequente translocação para o núcleo ativando a transcrição de
29 E3 ligases, como a Murf-1 e Atrogin-1 (DE LIMA *et al.*, 2016). Essas E3 ligases são
30 responsáveis por marcar as proteínas defeituosas para entrarem no sistema ubiquitina-
31 proteassoma e serem degradadas em peptídeos (KAVAZIS; SMUDER; POWERS, 2014).
32 Assim, quanto mais proteínas forem marcadas com as E3 ligases, maior será a ativação do

1 ubiquitina-proteassoma o que culmina num aumento da degradação de proteínas (KAVAZIS;
2 SMUDER; POWERS, 2014; WILLIS *et al.*, 2019).

3 No músculo cardíaco os resultados encontrados são parecidos. O aumento exacerbado
4 de ERO é o principal responsável pela cardiotoxicidade induzida pelo tratamento com
5 doxorrubicina (SONGBO *et al.*, 2019). Os cardiomiócitos são as células que mais consomem
6 oxigênio no nosso organismo (cerca de 0,1ml de oxigênio por minuto em repouso) e por isso
7 são as células com maior volume de mitocôndrias do nosso organismo, assim, essa grande
8 quantidade de mitocôndrias nos cardiomiócitos é uma das explicações pelas quais o coração é
9 um alvo dos efeitos colaterais do tratamento com doxorrubicina e tende a sofrer lesões
10 (GOFFART; VON KLEIST-RETZOW; WIESNER, 2004; SONGBO *et al.*, 2019).

11 Cerca de 50% dos pacientes submetidos ao tratamento com doxorrubicina irão
12 apresentar alguma cardiotoxicidade ao longo da vida (CARVER; SZALDA; KY, 2013). De
13 acordo com resultados obtidos com exames de ressonância magnética em pacientes, a
14 cardiotoxicidade aguda já aparece após um mês de início da terapia com antraciclina,
15 caracterizada pela diminuição da massa do músculo cardíaco (WILLIS *et al.*, 2019).

16 Em animais, o tratamento com doxorrubicina também induz a uma rápida diminuição
17 no peso do músculo cardíaco, sendo esse efeito agudo por conta da atrofia dos cardiomiócitos
18 (WILLIS *et al.*, 2019). Para verificar os mecanismos envolvidos na atrofia induzida pelo
19 tratamento de doxorrubicina Willis et al (2019) utilizaram uma dosagem de 20mg/kg de
20 doxorrubicina durante 7 dias e encontraram aumento na expressão de Murf-1 no coração de
21 camundongos. Após isso, submeteram camundongos congênicos Murf-1^{-/-} ao mesmo
22 tratamento com doxorrubicina e observaram que esses animais estavam protegidos da atrofia
23 cardíaca induzida pela doxorrubicina (WILLIS *et al.*, 2019). Esses resultados demonstraram
24 um importante papel da Murf-1 na atrofia cardíaca aguda promovida pela doxorrubicina
25 (WILLIS *et al.*, 2019).

26 Os pacientes tratados com doxorrubicina frequentemente apresentam perda de massa
27 muscular e reclamam de fraqueza e fadiga, o que prejudica a qualidade de vida dos pacientes
28 (GILLIAM; ST. CLAIR, 2011; HIENSCH *et al.*, 2020; RYAN *et al.*, 2019). A perda de força
29 e perda de função muscular podem ser o produto dessa degradação muscular exacerbada

1 (HAYWARD *et al.*, 2013; TARPEY *et al.*, 2019). Tais efeitos adversos relacionam-se com
2 diferentes condições patológicas, dentre elas, a sarcopenia.

3 4.2 DOXORRUBICINA, SARCOPENIA E FRAGILIDADE

4 As alterações no músculo esquelético prejudicam a qualidade de vida dos sujeitos, por
5 essa razão a sarcopenia tem ganhado destaque na pesquisa nos últimos anos. A definição dada
6 para sarcopenia segundo o Consenso Europeu de sarcopenia (2019) caracteriza a alteração
7 como uma desordem muscular progressiva e generalizada que compromete a função física do
8 indivíduo aumentando o risco de quedas, fraturas e a mortalidade.

9 A sarcopenia foi por muito tempo associada à idade, muitos pensavam que a
10 sarcopenia só estava presente em pessoas idosas. Bauer et al (2019) caracterizam dois tipos de
11 sarcopenia, e definiram a sarcopenia primária como aquela relacionada à idade e a sarcopenia
12 secundária relacionada a doenças. Essa última apresenta-se mais comumente associada ao
13 câncer (BAUER *et al.*, 2019). Já foi descrito que pacientes com câncer de cólon podem
14 perder, em um período de 12 meses, massa muscular equivalente ao que um adulto sem
15 câncer perderia em 30 anos (correspondente a uma perda acumulativa de ~15.6% de massa
16 muscular) (BAUER *et al.*, 2019).

17 Atualmente, a primeira análise realizada para diagnosticar a sarcopenia em pacientes
18 são os testes de força, como por exemplo o *hand grip* ou o teste de sentar e levantar da cadeira
19 (CRUZ-JENTOFT *et al.*, 2019). A confirmação do diagnóstico de sarcopenia se dá através da
20 avaliação da ‘qualidade e quantidade muscular’, termo utilizado pelos autores do trabalho
21 para avaliar os aspectos macroscópicos e microscópicos da arquitetura do músculo (CRUZ-
22 JENTOFT *et al.*, 2019). Essa análise da estrutura muscular basea-se nos resultados de índice
23 de massa corporal, área de secção transversa calculada na biópsia muscular, ressonância
24 magnética, tomografia, absorciometria de raio-x de dupla energia (DXA), bioimpedância,
25 entre outras estratégias (CRUZ-JENTOFT *et al.*, 2019). Por fim, para avaliar a severidade da
26 sarcopenia são feitos os testes de função, como por exemplo, a velocidade de marcha, e uma
27 bateria de testes de desempenho (SPPB- *Short physical performance battery*), teste *timed Up*
28 *and Go*, teste de caminhada de 400m, entre outros (CRUZ-JENTOFT *et al.*, 2019).

29 O estudo de revisão realizado por Bozzetti (2020) mostrou que o tratamento com
30 alguns quimioterápicos, como por exemplo taxanos, poliquimioterapia (dapsona, clofazimina e

1 rifampicina), capecitabina, epirrubicina, cisplatina entre outros, parece ser capaz de induzir a
2 sarcopenia, aumentando a toxicidade do medicamento e reduzindo a qualidade de vida dos
3 pacientes. Todos esses quimioterápicos apresentam mecanismos parecidos com o da
4 doxorrubicina. Um dos mecanismos de atuação descritos da doxorrubicina é a interrupção do
5 ciclo celular impedindo a replicação e síntese do DNA (KIM; LEE; KIM, 2009; KWON,
6 2020). Os outros quimioterápicos citados também atuam inibindo a síntese e replicação de
7 DNA e/ou RNA (MALTZMAN; MILLAR, 2010). Bozzetti (2020) relatou em sua revisão de
8 literatura que após o início do tratamento com alguns desses quimioterápicos o número de
9 pacientes que apresentaram sarcopenia aumentou. Moroshita (2016) analisou o quadro de
10 sarcopenia em pacientes antes e após quimioterapia e observou aumento de 19% na incidência
11 de sarcopenia após o início do tratamento.

12 Outro parâmetro utilizado para prever a mortalidade e a morbidade que está
13 fortemente associado com a sarcopenia é a fragilidade dos pacientes (GENSOUS *et al.*, 2019;
14 HAO *et al.*, 2019; PAMOUKDJIAN *et al.*, 2020; SPEECHLEY; TINETTI, 1991). A
15 fragilidade é um conceito que auxilia a identificar pessoas que precisam de cuidados especiais
16 (COLLARD *et al.*, 2012). A principal característica de pessoas consideradas frágeis é a
17 incapacidade física a qual resulta numa falta de independência, apresentando alto risco de
18 quedas o que aumenta os gastos com cuidados com a saúde e a hospitalização (RIBEIRO;
19 HOWLETT; FERNANDES, 2020). Os principais sinais que pessoas frágeis apresentam são
20 fraqueza, caminhada lenta, perda de peso corporal e baixa atividade física (RIBEIRO;
21 HOWLETT; FERNANDES, 2020).

22 Inicialmente a fragilidade foi associada com a idade, partindo da ideia de que ao longo
23 da vida devido ao processo de envelhecimento as pessoas se tornam frágeis e dependentes de
24 cuidados (SPEECHLEY; TINETTI, 1991). Atualmente, a fragilidade tem sido usada para
25 avaliar a vulnerabilidade de doenças, principalmente, de pacientes com câncer, HIV (vírus da
26 imunodeficiência humana), doenças cardiovasculares e demências (RIBEIRO; HOWLETT;
27 FERNANDES, 2020).

28 Conhecendo que a sarcopenia e a fragilidade podem atrasar o tratamento dos pacientes
29 com câncer, diminuir a chance de cura e estão associados ao aumento da mortalidade fica
30 claro a importância de buscar estratégias para auxiliar e retardar o aparecimento dos sintomas

1 relacionados a essas variáveis, como por exemplo a perda de força, de peso corporal e de
2 função física (BOZZETTI, 2020; RIBEIRO; HOWLETT; FERNANDES, 2020).

3 Uma das medidas recomendadas para auxiliar no conhecimento e prevenção da
4 sarcopenia e da fragilidade são as abordagens nutricionais que contribuem para a manutenção
5 da massa muscular e a combinação de estratégias que promovam aumento do anabolismo,
6 como por exemplo o exercício físico e sua associação com a nutrição (BAUER *et al.*, 2019).
7 Outra tarefa que precisa ser desenvolvida é estudar as vias patofisiológicas que levam à
8 sarcopenia e a fragilidade, como por exemplo as vias de sinalização que ativam ou inibem
9 síntese e degradação de proteínas (BAUER *et al.*, 2019; RIBEIRO; HOWLETT;
10 FERNANDES, 2020).

11 4.3 SUPLEMENTAÇÃO DE CREATINA

12 A suplementação de creatina tem recebido considerável atenção da área médica. A
13 creatina é sintetizada endogenamente pelo nosso organismo, entretanto 50% da creatina usada
14 diariamente é proveniente da alimentação sendo encontrada nas carnes vermelhas, peixes e
15 aves e o restante é resultado da síntese endógena do organismo e grande parte é encontrada no
16 músculo e cérebro (DIET *et al.*, 2011; SMITH; AGHARKAR; GONZALES, 2014). A
17 principal função da creatina é se ligar ao fosfato através da enzima creatina quinase, formando
18 assim a fosfocreatina (PCr) (CANDOW *et al.*, 2019). Esse processo é importante para o
19 organismo pois facilita a transformação do ADP (difosfato de adenosina) em ATP (adenosina-
20 trifosfato), basta que haja a doação do fosfato da PCr para o ADP que será possível ter energia
21 disponível pronta para utilização nas células, o ATP (CANDOW *et al.*, 2019).

22 O principal objetivo da suplementação de creatina é aumentar a reserva de PCr no
23 músculo esquelético, entretanto sua ação parece ir além da sua função energética
24 (GUALANO *et al.*, 2012). Seu reconhecimento na área médica se deve aos efeitos
25 antioxidantes descritos pela primeira vez por Lawler *et al.* (2002). Ainda, seu efeito no
26 fornecimento de energia contribui na manutenção do peso corporal e da massa muscular e
27 seus efeitos anti-inflamatórios são conhecidos em algumas doenças que promovem aumento
28 do catabolismo proteico, como tumores, esclerose lateral amiotrófica, imobilizações e
29 distrofia de Duchenne (BASSIT; CURI; COSTA ROSA, 2008; CAMPOS-FERRAZ *et al.*,
30 2016; CANDOW *et al.*, 2019; CELLA *et al.*, 2019; DEMINICE *et al.*, 2009; DEMINICE;

1 JORDAO, 2012; KLEY; VORGERD; TARNOPOLSKY, 2007; LAWLER *et al.*, 2002;
2 TARNOPOLSKY *et al.*, 2004).

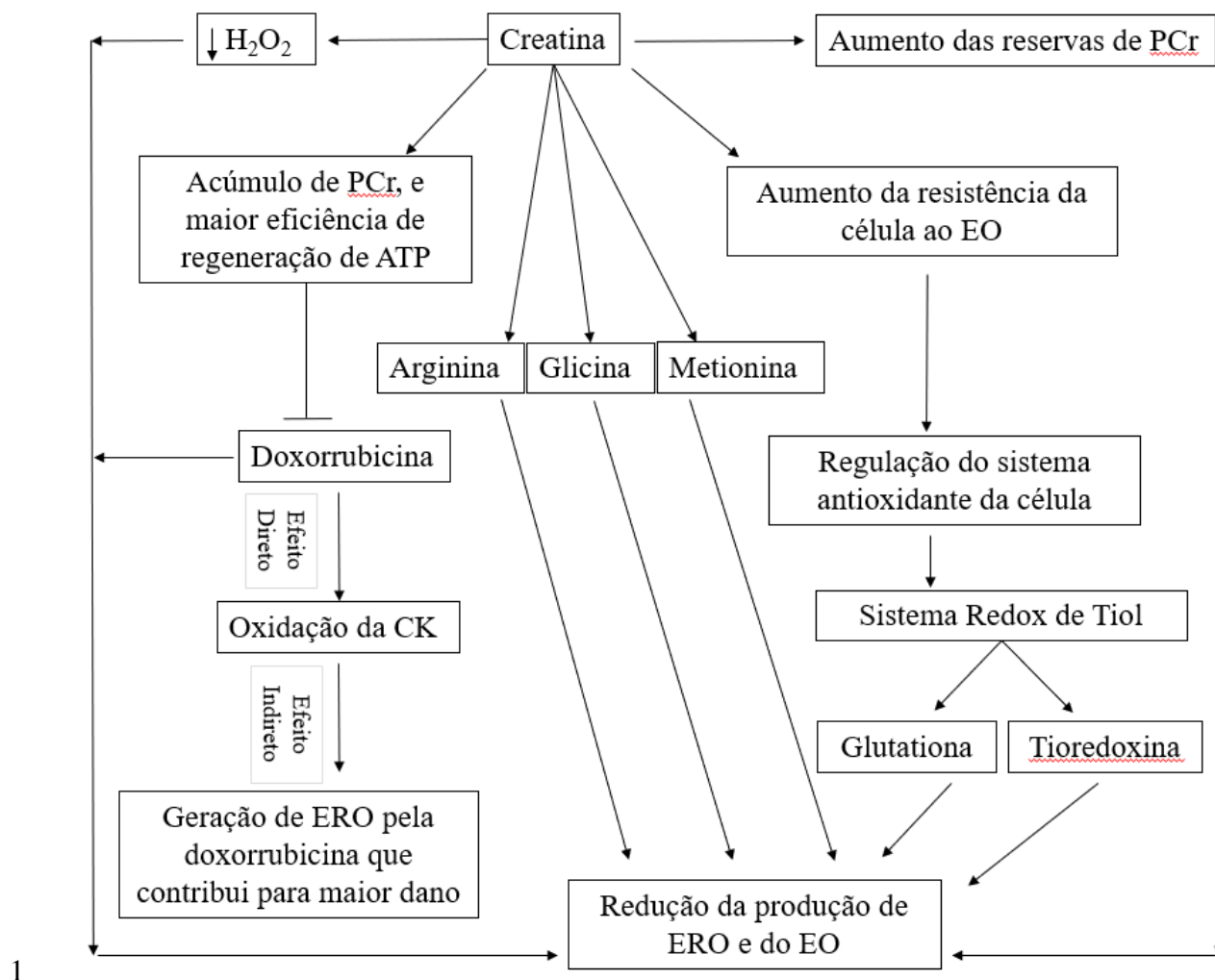
3 Alguns estudos mostraram também evidências de que a suplementação de creatina,
4 com ou sem exercício, é capaz de amenizar alguns efeitos promovidos pela sarcopenia
5 primária (induzida pela idade), promovendo aumento da força e da massa muscular,
6 reduzindo o risco de quedas, melhorando a performance física e talvez atuando na densidade
7 mineral óssea (CANDOW *et al.*, 2019). O efeito apenas da suplementação de creatina na
8 sarcopenia é controverso, alguns estudos apresentam melhora enquanto outros não apresentam
9 alterações (CANDOW *et al.*, 2019). Quando analisada a suplementação de creatina com o
10 exercício resistido os resultados são mais consistentes e as melhoras estão mais presentes
11 (CANDOW *et al.*, 2019).

12 Os possíveis mecanismos que explicam essa contribuição da suplementação de
13 creatina na manutenção da massa muscular, envolvem a superexpressão da proteína da via de
14 síntese da mTOR (*mammalian target of the rapamycin*), e aumento da expressão do IGF-1
15 (insulin-like growth fator-1) que também está relacionado com a via da mTOR (CANDOW *et*
16 *al.*, 2019). Recentemente, foi demonstrado importante papel da suplementação de creatina em
17 reduzir a proteólise via ubiquitina-proteassoma mediante redução da geração de radicais livres
18 e de mediadores anti-inflamatórios em animais inoculados com tumor de Walker-256,
19 diminuindo a ativação das principais E3 ligases do sistema ubiquitina-proteassoma, como a
20 Murf-1 e a Atrogin-1 (CELLA *et al.*, 2019).

21 Uma das hipóteses do possível efeito protetor da suplementação de creatina nos efeitos
22 colaterais do tratamento com doxorrubicina está presente na Figura 2. Acredita-se que a
23 suplementação de creatina possa diminuir o estresse oxidativo e o aumento de ERO induzido
24 pela doxorrubicina devido seu papel protetor como antioxidante (ARAZI; EGHBALI;
25 SUZUKI, 2021; FIMOGNARI *et al.*, 2009; GUIDI *et al.*, 2008; SESTILI *et al.*, 2006). O
26 efeito antioxidante indireto da suplementação de creatina se deve a redução da síntese de
27 creatina pelos aminoácidos arginina, glicina e metionina, uma vez que esses aminoácidos não
28 precisam sintetizar a mesma quantidade de creatina, eles ficam disponíveis para outras
29 funções do organismo, como por exemplo, síntese de proteínas, de óxido nítrico e glutatona
30 (ARAZI; EGHBALI; SUZUKI, 2021; LAWLER *et al.*, 2002; WU; MORRIS, 1998). Além
31 disso, a suplementação de creatina aumenta as reservas de PCr por promover melhora na

1 eficiência de regenerar ATP, aumenta a resistência da célula ao estresse oxidativo (através da
2 melhora do sistema redox da glutatona e da tioredoxina) e ainda apresenta um efeito
3 antioxidante direto reduzindo o peróxido de hidrogênio (Figura 2) (ARAZI; EGHBALI;
4 SUZUKI, 2021; LAWLER *et al.*, 2002).

5 Além de prejudicar a função mitocondrial e comprometer a função energética da
6 célula, a doxorubicina ainda tem efeito direto sobre a enzima creatina quinase, como
7 apresentado na Figura 2 (ARAZI; EGHBALI; SUZUKI, 2021; FIMOGNARI *et al.*, 2009).
8 Devido a sua estrutura quinona, a doxorubicina facilmente oxida a creatina quinase com seu
9 grupamento tiol (SH) danificando a enzima creatina quinase dificultando a formação de
10 energia (ARAZI; EGHBALI; SUZUKI, 2021; FIMOGNARI *et al.*, 2009). Acredita-se que
11 melhorando a regeneração de ATP e exercendo ação antioxidante, a suplementação de
12 creatina seja capaz de inibir a ação redox da doxorubicina sobre a enzima creatina quinase
13 (Figura 2) (ARAZI; EGHBALI; SUZUKI, 2021; FIMOGNARI *et al.*, 2009).



1

2 **Figura 2-** Efeito da suplementação de creatina no estresse oxidativo. ATP: adenosina-
 3 trifosfato; CK: creatina quinase; EO: estresse oxidativo; ERO: espécies reativas de oxigênio;
 4 PCr: fosfocreatina; H₂O₂: peróxido de hidrogênio. Fonte. Adaptado e traduzido de Arazi,
 5 Eghbali, Suzuki, (2021).
 6

7 Assim, considerando os efeitos colaterais da doxorrubicina e os efeitos anti-
 8 inflamatórios, antioxidantes, anti-atróficos da creatina, alguns autores começaram a investigar
 9 a capacidade da suplementação de creatina amenizar os efeitos colaterais induzidos pela
 10 doxorrubicina (ALJOBAILY *et al.*, 2021; BREDAH.; HYDOCK, 2017; BREDAHL, *et al.*,
 11 2020; SANTACRUZ *et al.*, 2015; TOROK; BUSEKRUS; HYDOCK, 2020). Utilizando
 12 cultura de células, Bredahl *et al.*, (2020) analisaram mioblastos de músculo esquelético
 13 (RSKMC) e miócitos cardíacos (H9C2) de ratos e expostos à 25 µM doxorrubicina com 10
 14 µM de creatina. Nessa concentração de creatina, foi encontrado um efeito citoprotetor tanto
 15 nas células do músculo esquelético quanto nas do músculo cardíaco (BREDAHL, ERIC
 16 CHRISTOPHER *et al.*, 2020). Nos estudos com animas, a suplementação com creatina trouxe

1 melhoras para o fígado, coração e músculos (ALJOBAILY *et al.*, 2021; BREDAHL;
2 BUSEKRUS; HYDOCK, 2020; SANTACRUZ *et al.*, 2015; TOROK; BUSEKRUS;
3 HYDOCK, 2019). Entre essas melhoras encontrou-se redução do estresse oxidativo hepático,
4 da fibrose e da inflamação, com administração intraperitoneal (i.p.) de 15 mg/kg de
5 doxorrubicina e 2% de creatina na ração por 4 semanas (ALJOBAILY *et al.*, 2021). As
6 melhoras encontradas no músculo esquelético e cardíaco foram mais exploradas em modelo
7 *ex vivo* (BREDAHL.; HYDOCK, 2017). Neste modelo, o músculo sóleo e o EDL (extenso
8 longo dos dedos) foram incubados com 25 μ M de creatina e 24 μ M de doxorrubicina, sendo
9 que a creatina protegeu o músculo dos animais do grupo doxorrubicina e creatina,
10 apresentado uma força de produção e a taxa máxima de força de produção iguais aos
11 apresentados no músculo do grupo controle, parâmetro para análise de fadiga (BREDAH;
12 HYDOCK, 2017). No grupo incubado apenas com doxorrubicina constatou-se aumento mais
13 baixo na força de produção no músculo EDL (BREDAHL.; HYDOCK, 2017).

14 Os efeitos da suplementação de creatina *in vivo* e os possíveis mecanismos protetores
15 sobre a toxicidade muscular induzida pela doxorrubicina no músculo esquelético e cardíaco
16 ainda são pouco explorados. O mecanismo encontrado da ação da creatina sobre os danos
17 causados pela doxorrubicina é principalmente, devido à redução do estresse oxidativo e da
18 inflamação (ALJOBAILY *et al.*, 2021). As vias de sinalização que induzem atrofia
19 muscular ainda não foram analisadas. Sabe-se que a doxorrubicina ativa uma série de vias,
20 como a autofagia, ubiquitina-proteassoma, calpaínas e caspases-3 e que a suplementação de
21 creatina pode exercer ação sobre alguns desses sistemas (CELLA *et al.*, 2019; KAVAZIS;
22 SMUDER; POWERS, 2014; WILLIS *et al.*, 2019).

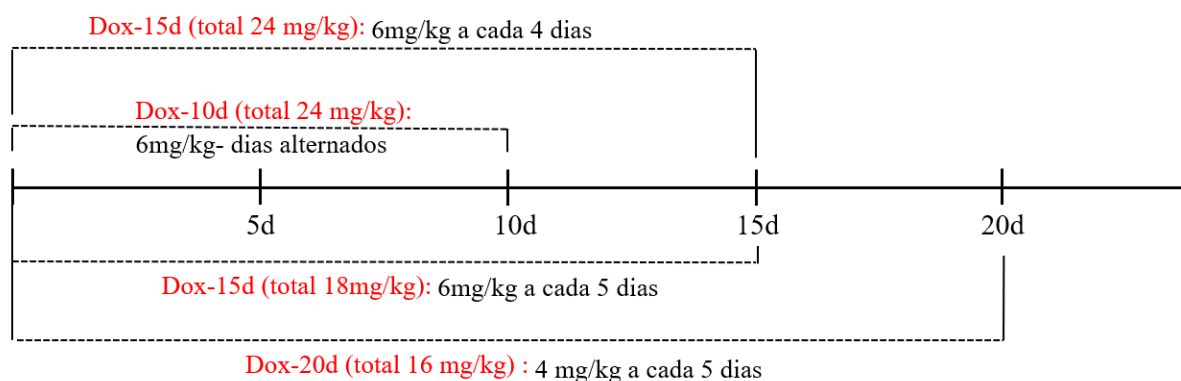
1 5. METODOLOGIA

2 5.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

3 Foram utilizados neste estudo, 100 camundongos da linhagem C57/BL/6, pesando
4 ~22g provenientes da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos durante todo o
5 experimento no Biotério do Centro de Educação Física (CEFE), da Universidade Estadual de
6 Londrina. Os animais foram acomodados em gaiolas contendo 5 ou no máximo 6 animais,
7 com ração Nuvilab CR-1, Nuvital e água *ad libitum*. Todos os procedimentos foram
8 realizados após aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da
9 Universidade Estadual de Londrina, registado sob o processo CEUA nº 11131.2019.07 e
10 seguiram as recomendações do Conselho Nacional de Experimentação Animal. Os animais
11 foram adaptados por duas semanas ao biotério do CEFE antes de iniciar os experimentos. Os
12 ciclos de quimioterapia de todos os experimentos foram realizados através de injeções
13 intraperitoneais com cloridrato de doxorrubicina (Bergamo, Brasil). Neste trabalho foram
14 realizados três experimentos, que serão detalhados a seguir.

15 5.2 EXPERIMENTO 1

16 O objetivo deste experimento foi desenvolver modelo pré-clínico de tratamento de
17 doxorrubicina em ciclos, compatível com o tratamento de pacientes oncológico, que seja útil
18 para estudo de miopatias em camundongos. Para isto, 30 camundongos C57/BL/6 foram
19 agrupados em um dos cinco grupos experimentais (Figura 3): controle (C; n=6) que
20 receberam injeções com solução salina; e quatro grupos (n=6/grupo) receberam injeções
21 intraperitoneais com doxorrubicina, nos seguintes esquemas: Dox-10d (24mg/kg): 4 doses na
22 concentração de 6mg/kg em dias alternados durante 10 dias, totalizando 24mg/kg; Dox-15d
23 (24mg/kg): 4 doses na concentração de 6mg/kg a cada 4 dias durante 15 dias, totalizando
24 24mg/kg; Dox-15d (18mg/kg): 3 doses concentração de 6mg/kg a cada 5 dias durante 15 dias,
25 totalizando 18mg/kg e Dox-20d (16mg/kg): concentração de 4mg/kg a cada 5 dias durante 20
26 dias, totalizando 16mg/kg.



1

2 **Figura 3-** Delineamento experimental 1. Dox-10d (24mg/kg): 4 doses intraperitoneais de
 3 doxorrubicina na concentração de 6mg/kg em dias alternados durante 10 dias, totalizando
 4 24mg/kg; Dox-15d (24mg/kg): 4 doses na concentração de 6mg/kg a cada 4 dias durante 15
 5 dias, totalizando 24mg/kg; Dox-15d (18mg/kg): 3 doses concentração de 6mg/kg a cada 5
 6 dias durante 15 dias, totalizando 18mg/kg; Dox-20d (16mg/kg): concentração de 4mg/kg a
 7 cada 5 dias durante 20 dias, totalizando 16mg/kg; d: dias.

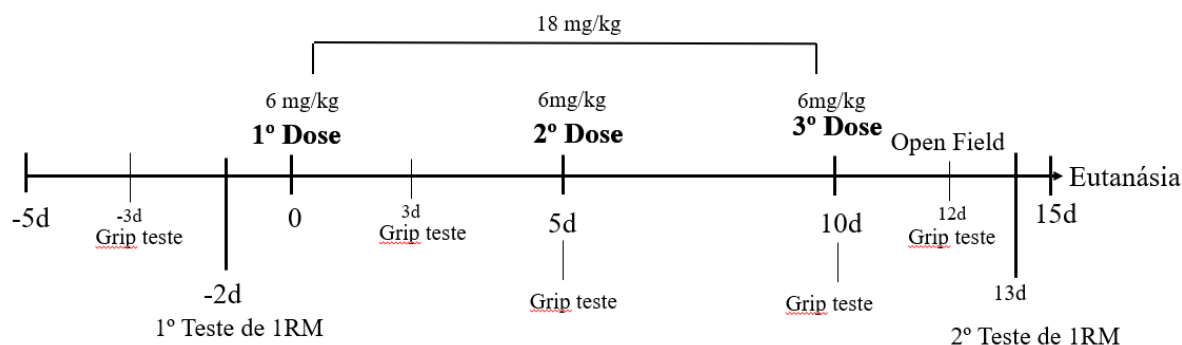
8

9 Num primeiro momento, para monitoramento das condições de saúde do animal
 10 observamos o peso corporal. Caso o animal apresentasse perda de peso acima de 15% do peso
 11 corporal inicial o animal apresentava caquexia severa, e se estivessem com pelos arrepiados e
 12 opacos, e respiração acelerada, a eutanásia do animal era realizada. Em contrapartida, se a
 13 perda corporal de até 14% os animais não eram eutanasiados dependendo das condições
 14 acima mencionadas que apresentavam (NI; ZHANG, 2020).

15 5.3 EXPERIMENTO 2

16 Este experimento teve como objetivo determinar o efeito do tratamento em ciclos de
 17 doxorrubicina sobre os principais moderadores da sarcopenia e fragilidade em camundongos.
 18 Baseado nos resultados do experimento 1, escolhemos o protocolo de 3 doses de 6mg/kg de
 19 doxorrubicina, a cada 5 dias por um total de 15 dias. O delineamento experimental 2 está
 20 apresentado na Figura 4. Foram utilizados 12 camundongos da linhagem C57/BL/6, que
 21 foram alocados em um dos dois grupos (n=6/grupo): controle (C) que recebeu injeções salinas
 22 e tratados com doxorrubicina (Dox). Após 15 dias da primeira administração intraperitoneal
 23 com doxorrubicina, foi feita a eutanásia dos animais (Figura 4). O peso corporal dos animais
 24 foi monitorado todos os dias e a ingestão alimentar foi determinada duas vezes por semana.
 25 Os testes de força de escalada foram realizados 48h antes da primeira dose de doxorrubicina e
 26 48h antes da eutanásia dos animais (13 dias depois do início do tratamento com
 27 doxorrubicina). A força de tração dos animais foi acompanhada por meio da análise da

1 progressão de força muscular através do teste *Grip strenght meter*, realizado duas vezes na
 2 semana. O teste de campo aberto para cálculo do score de fragilidade foi realizado três dias
 3 antes da eutanásia.



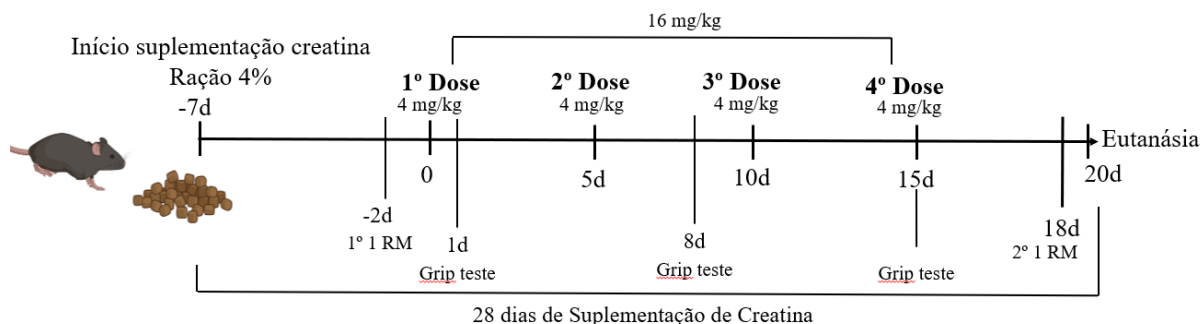
4

5 **Figura 4-** Delineamento Experimental 2. 1RM: uma repetição máxima, análise do ganho de
 6 força muscular; d: dias; Grip teste: Grip strength teste, análise da força muscular de tração.

7

8 5.4 EXPERIMENTO 3

9 O objetivo desse experimento foi verificar os efeitos da suplementação com creatina
 10 sobre a toxicidade muscular promovida pelo tratamento com doxorrubicina. Para isso, a
 11 recomendação para que a suplementação de creatina seja efetiva é de pelo menos 28 dias, por
 12 essa razão uma dose menor de doxorrubicina por um período mais longo foi utilizada, a dose
 13 de 4 mg/kg por 15 dias a qual, de acordo com o experimento 1, também induzia perda
 14 significativa de massa corporal e não promovia a morte dos animais (HULTMAN *et al.*, 1996;
 15 KREIDER *et al.*, 2017). Neste experimento foram utilizados 30 animais separados em três
 16 grupos: Controle que recebeu injeções (i.p.) com solução salina (n=10), grupo tratado com
 17 doxorrubicina (Dox; n=10) e grupo tratado com doxorrubicina e suplementados com creatina
 18 (DoxCr; n=10). Os grupos Dox e DoxCr receberam 4 injeções (i.p.) com doxorrubicina a cada
 19 5 dias numa concentração de 4mg/kg durante 20 dias, totalizando 16mg/kg de doxorrubicina,
 20 conforme delineamento experimento da Figura 5. A suplementação de creatina do grupo
 21 DoxCr foi realizada por 28 dias e iniciada uma semana antes da primeira dose de
 22 doxorrubicina para os animais se adaptarem com a ração (Figura 5).



1

2 **Figura 5-** Delineamento experimental 3 1RM: uma repetição máxima para análise do ganho
 3 de força muscular; d: dias; Grip teste: *Grip strength* teste para análise da força muscular de
 4 tração.

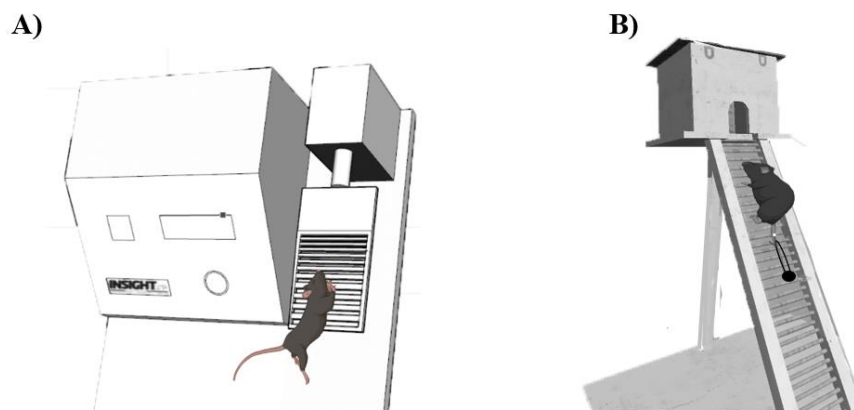
5

6 A suplementação de creatina foi colocada na ração dos animais no nosso laboratório
 7 conforme descrito a seguir. Os *pellets* de ração da marca Nuvilab CR-1, Nuvital foram
 8 pesados e misturados em água por um pilão até virarem uma pasta na proporção 1:1 (50g de
 9 ração para 50ml de água). Os grupos C e Dox receberam essa ração enquanto o grupo DoxCr
 10 recebeu a mesma ração, porém com 4% de creatina. Os animais de todos os grupos foram
 11 adaptados a ração nova por uma semana. Após uma semana de adaptação os animais
 12 receberam a primeira injeção com doxorrubicina. Após 20 dias da primeira injeção com
 13 doxorrubicina foi feita a eutanásia dos animais. De forma similar ao experimento 2, foram
 14 utilizados dois testes para analisar o ganho de força (Teste de escada de 1RM) e a progressão
 15 de força (*Grip strength meter*). O teste de progressão de força nesse experimento foi realizado
 16 apenas 1x por semana.

17 5.5 DETERMINAÇÃO DA FORÇA, FUNÇÃO FÍSICA E FRAGILIDADE FUNCIONAL

18 *Força muscular:* a força muscular dos animais foi analisada através de dois métodos
 19 *Grip strength meter* (Insight, Brasil) e 1RM (teste de uma repetição máxima). No teste *Grip*
 20 *strength meter*, o animal é posicionado na grade de metal do equipamento, quando o animal se
 21 segura na grade com suas patas dianteiras o pesquisador faz uma tração pelo rabo do animal
 22 (figura 6A). Dessa forma o equipamento é capaz de quantificar o pico de força aplicado pelos
 23 camundongos ao tentarem se segurar na barra de metal quando submetidos à tração realizada
 24 pelo pesquisador. O pico de força no momento da tração fica registrado no display digital do
 25 equipamento e é posteriormente avaliado pelo pesquisador. Os animais tinham 5 tentativas,

1 após cada tentativa os animais descansavam por 20 segundos. Nesse trabalho foi apresentado
2 a média das tentativas. O teste foi realizado duas vezes por semana.



3

4 **Figura 6-** Testes de força muscular A) Aparelho para avaliação da tração muscular para
5 análise da progressão muscular pelo teste *Grip strength Meter*; B) Escada do teste de uma
6 repetição máxima (1RM).

7

8 No teste de 1RM (uma repetição máxima) na escada foi analisado o ganho de força
9 dos animais. Os animais de todos os grupos foram adaptados (antes do início do tratamento
10 com doxorrubicina) durante cinco dias consecutivos a subirem numa escada adaptada para
11 camundongos onde realizavam de 8 a 12 movimentos dinâmicos para completarem a subida
12 (dimensões da escada 0,55m x0,18m x0,7cm, com 80° de inclinação) (figura 6B). No topo da
13 escada havia uma caixa escura (20x20x20 cm) construída para os animais poderem descansar
14 e se sentirem seguros entre as subidas. Após o período de adaptação os animais de todos os
15 grupos realizaram o teste de 1RM. O teste consistia em os animais subirem a escada com uma
16 carga amarrada no rabo por um elástico de borracha; a carga inicial foi de 100% do peso
17 corporal sendo acrescentado 3g a cada subida bem-sucedida. Depois de cada subida os
18 animais descansavam por 2 minutos na caixa escura. O teste era finalizado quando o animal
19 apresentasse duas falhas consecutivas com a mesma carga. Ao final do experimento, os
20 animais realizaram o mesmo teste, porém, a carga inicial do segundo teste de 1RM foi
21 baseada na carga máxima carregada no primeiro teste de 1RM.

22 *Função Física:* A capacidade de locomoção e exploração dos animais foi determinada
23 através do teste de campo aberto, em que os animais foram expostos por 5 minutos a um
24 campo novo e inexplorado medindo 50x50 cm. Durante todo o período eles foram filmados

1 com uma câmera digital (Longitech, modelo c920, 30Hz). As imagens foram adquiridas
2 usando software Dvídeo que permite calcular o movimento do animal na área de teste por
3 meio de um sistema bidimensional de coordenadas baseadas no método Direct Linear
4 Transformation, proposto por Abdel-aziz; Karara (2015). O software permite detectar o ponto
5 central do animal e rastrear seus movimentos, atividades e comportamentos durante um
6 período de tempo especificado. As variáveis analisadas foram a) distância total percorrida em
7 5 minutos; b) distância máxima percorrida entre os momentos que os animais ficam parados;
8 c) duração total do movimento (segundos); d) tempo total gasto se movimentando; e)
9 *meander* (mudança de direção por unidade de distância percorrida- graus/cm; de 0° a 180°); f)
10 velocidade média de movimento em 10 minutos (cm/s); e g) *rearing* (número de vezes que o
11 animal fica sob suas patas traseiras, 'em pé'). A trajetória capturada de cada camundongo foi
12 processada por um filtro digital Butterworth de frequência de corte de 1Hz.

13 A fragilidade foi calculada com base em oito parâmetros que em geral refletem nível
14 de atividade física (quantificados através do teste de campo aberto) e peso corporal, conforme
15 descrito por Whitehead *et al.*, (2014). Valores que forem diferentes dos valores de referência
16 por menos de 1 DP receberão uma pontuação de 0. Valores que forem $\pm 1DP$ com relação ao
17 valor médio de referência receberão um score de fragilidade de 0,25. Aqueles que a diferença
18 for por $\pm 2DP$ serão pontuados com score de 0,5; valores $\pm 3DP$ da média receberão o valor
19 máximo de fragilidade de 1. Por fim, os valores serão somados e divididos pelo número de
20 parâmetros analisados, no caso oito parâmetros), para fornecer uma pontuação de fragilidade
21 de 0 a 1 para cada animal. Um $score=0$ o animal é considerado sem nenhuma fragilidade;
22 $score=0,5$ o animal é considerado com uma fragilidade moderada e $score=1$ o animal é
23 considerado com uma fragilidade severa.

24 5.6 EUTANÁSIA E PREPARAÇÃO DOS TECIDOS

25 A eutanásia aconteceu 48h após o último teste de 1RM. Os animais foram anestesiados
26 com isoflurano (Instituto Biochimico IND. Farm. LTDA- RJ) e a eutanásia feita por
27 exsanguinação. Em seguida, foi realizada laparotomia para colheita pesagem do coração,
28 fígado, baço, gastrocnêmio, sóleo e EDL. Para análise histológica no experimento 2, o
29 coração de quatro e os músculos esqueléticos (gastrocnêmio, EDL, diafragma e sóleo) foram
30 separados. Para análise histológica do experimento 3, o coração de 4 animais, os músculos
31 esqueléticos e o baço foram colhidos. Para análises bioquímicas do experimento 3, o coração,

1 fígado e os músculos esqueléticos (Gastrocnêmio e quadríceps) foram congelados no -80 para
2 análises posteriores.

3 5.7 HISTOLOGIA

4 Para as análises microscópicas, os tecidos foram fixados em paraformaldeído (4%) por
5 24h, desidratados gradativamente em álcool (70, 90 e 100%) e impregnados com parafina
6 conforme descrito por Fonseca *et al.*, (2012). Os tecidos foram cortados numa espessura de 5
7 μm em micrótomo (SLEE® - CUT 6062). As fotos foram adquiridas por um microscópio
8 (BIOPTA- EK 1000T) de luz com câmera de vídeo (AmScope, 10 megapixels). Todas as
9 análises foram realizadas com o programa *Image J* (versão 1.8.0_172).

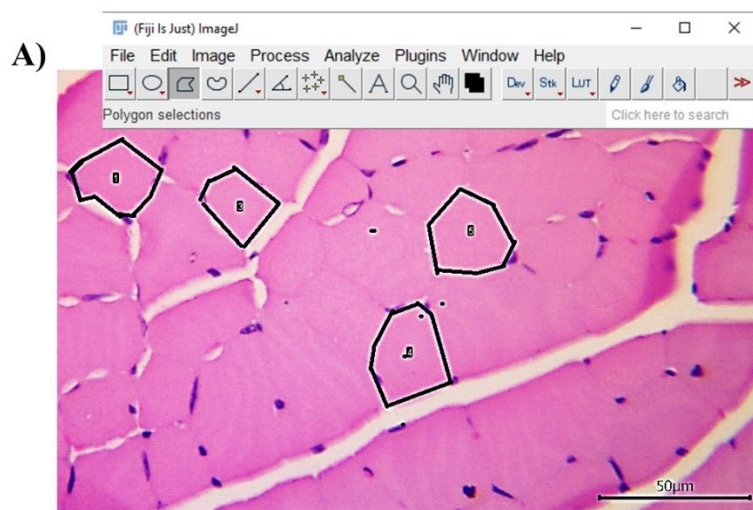
10 *Análise histológica músculos esqueléticos.*

11 Para determinar a área das fibras musculares do EDL, diafragma, Gastrocnemio e
12 sóleo analisou-se a área de secção transversa dos músculos. As lâminas foram coradas com
13 hematoxilina e eosina. Foram realizados 5 cortes transversais de cada peça. Após a coloração,
14 imagens representativas (aumento de 200x) foram adquiridas digitalmente por um
15 microscópio (BIOPTA- EK 1000T) de luz com câmera de vídeo (CMOS Bioptika, 5
16 megapixels). Foram tiradas aproximadamente 5 fotos por corte. A quantificação da área das
17 fibras musculares e a deposição de colágeno foram quantificadas num aumento de 20x. As
18 fibras foram quantificadas conforme apresentado na Figura 7A.

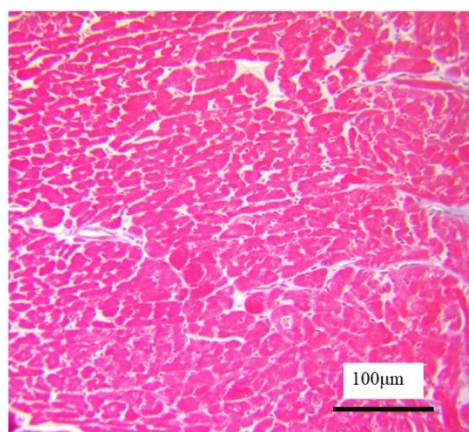
19 *Análise histológica músculo cardíaco*

20 Para o Experimento 1 foi realizado a análise do diâmetro dos cardiomiócitos, onde
21 foram analisadas fibras longitudinais num aumento de 40x. Para isso foram realizados dois
22 cortes de cada coração e corados com hematoxilina e eosina. Para o Experimento 2 foi
23 realizada a análise de deposição de colágeno no coração. Para isso, as lâminas foram coradas
24 com Tricômio de Masson. Foram realizados dois cortes de cada peça. Após a coloração,
25 imagens representativas (aumento de 200x) A quantificação da deposição de colágeno foi
26 quantificada num aumento de 20x, conforme Figura 7B.

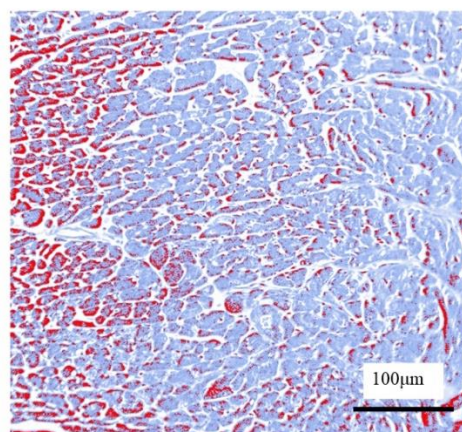
27



B)



C)



1

2 **Figura 7-** Quantificação da área de secção transversa (AST) e deposição de colágeno pelo
 3 programa Image J.

4 *Análise histológica baço*

5 Para análise da porcentagem de área de polpa branca as lâminas foram coradas com
 6 hematoxilina e eosina e foram quantificadas num aumento de 4x. Para as fotos representativas
 7 foi utilizado aumentos de 4x e de 20x. Para quantificação da área de polpa branca foi
 8 quantificado a área de ~quatro polpas brancas no baço de cada animal, totalizando
 9 aproximadamente 14 polpas brancas por grupo. Para quantificar a área da polpa branca foi
 10 medido a polpa branca de cada baço dividida pelo tamanho total do baço e multiplicado por
 11 100, conforme a fórmula abaixo:

12

$$\text{Área da polpa branca} = \frac{\text{tamanho da polpa}}{\text{tamanho total do baço}} \times 100$$

5.8 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Dosagem de Creatina, fosfocreatina (PCr) e Creatina Kinase

O músculo da coxa e o fígado foram homogeneizados com água destilada e centrifugado. Para dosar creatina foi utilizado o kit para Creatinina Labtest (ref 35-100; Minas Gerais/BR). A dosagem de creatina e PCr foi realizada de acordo com (DEMINICE *et al.*, 2009). A creatina quinase e a creatina quinase-MB foram dosadas no plasma pelo kit Labtest (respectivamente, ref 117 e ref 118; Minas Gerais/BR).

Dosagem de marcadores de estresse oxidativo

O estresse oxidativo foi determinado no músculo gastrocnêmio e no músculo cardíaco. A concentração de malondialdeído no músculo (MDA) foi determinada por MDA-MP (reação com 1-metil-2-fenolendol) adaptado de Spirlandeli *et al.* (2014). Concentrações musculares de glutathiona (GSH) e glutathiona oxidada (GSSG) foram quantificadas de acordo com o método descrito por Rahman, Kode e Biswas (2006).

Dosagem de citocinas inflamatórias

A citocinas foram analisadas no músculo gastrocnêmio e no músculo cardíaco. Para análise dos marcadores inflamatórios sistêmicos foi utilizado o kit ELISA Ready-SET-Go da eBioscience, para a interleucina 6 (IL-6 ref. 88-7064-88) e tumor de necrose tumoral-alfa (TNF- α ref. 88-7340-88).

5.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A normalidade dos dados foi testada por Shapiro-Wilk. No experimento 2, os dados paramétricos como perda de peso corporal, ingestão alimentar, peso dos tecidos e ganho de força pelo teste de escalada estão apresentados em média e desvio padrão onde foi utilizado *test-t* independente e para os dados não paramétricos como área de secção transversa dos músculos os dados estão apresentados em mediana (Md) e percentis onde foi utilizado o teste Mann-Whitney. Foi realizada correlação de Pearson para determinar associação entre o score de fragilidade com a área de secção transversa e com o ganho de força. No experimento 3, os dados paramétricos como peso dos tecidos, ganho de força pelo teste de escalada, dosagem de creatina, creatina quinase-MB, creatina quinase e de PCr, IL-6, TNF- α , GSH, GSSG, MDA e deposição de colágeno estão apresentados em média e desvio padrão onde foi utilizado ANOVA *one way*. Os dados não paramétricos como área de secção transversa dos músculos e porcentagem de área do folículo do baço estão apresentados em Md e percentis onde foi

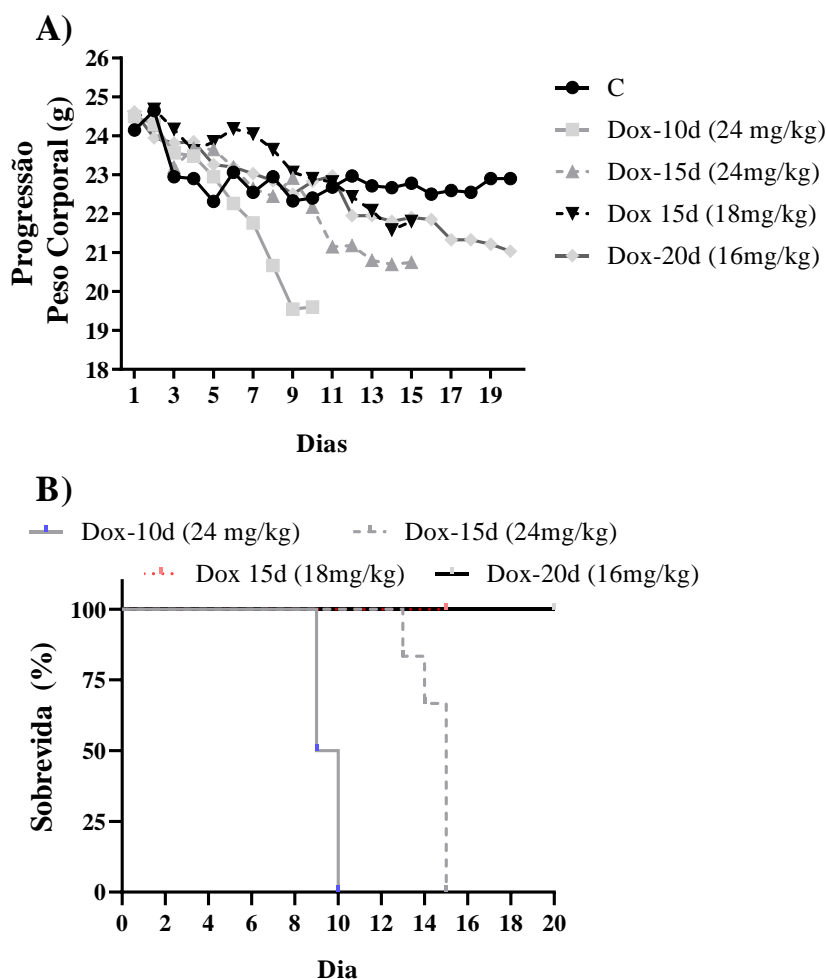
- 1 utilizado o teste Kruskal-Wallis. Para análise da progressão do peso corporal e da perda de
- 2 força analisado pelo *Grip strenght meter* foi utilizado *ANOVA Two- way* seguido de *post-hoc*
- 3 de Dunn. Os resultados foram considerados significativos quando $P < 0,05$. O programa *Graph*
- 4 *Pad Prism* 8.0 foi utilizado para as análises.

1 6 RESULTADOS

2 *Uso de doxorrubicina em ciclos é adequado como modelo experimental de tratamento*
3 *em pacientes oncológicos.*

4 Para determinar qual o esquema de tratamento (dose e intervalo de infusão) apresenta
5 características compatíveis com o tratamento quimioterápico em humanos (perda de peso
6 corporal sem a morte), comparamos quatro grupos com esquemas diferentes. As doses foram
7 selecionadas com base em doses clínicas utilizadas em pacientes com câncer (30 a 90 mg/m²),
8 dessa forma 24mg/kg equivale a 45-72 mg/m² em humanos, a qual é considerada uma dose
9 segura e não é uma superdosagem (NISSINEN *et al.*, 2016; TOKARSKA-SCHLATTNER *et*
10 *al.*, 2006).

11 Em ambos os grupos que foram tratados com 6 mg/kg de doxorrubicina, totalizando
12 24mg/kg alguns camundongo morreram, portanto essa dose foi considerado uma
13 superdosagem como é possível observar com base na Figura 8A) com a progressão de peso
14 corporal durante o experimento e na Figura 8. Os animais do grupo Dox-10d (dose
15 acumulativa de 24 mg/kg), que receberam 6mg/kg de doxorrubicina em dias alternados
16 durante 10 dias, morreram entre o nono e o décimo dia após a infusão. O grupo Dox-15d
17 (dose acumulativa de 24mg/kg), que recebeu 6mg/kg a cada 4 dias durante 15 dias,
18 apresentou duas mortes entre os dias 14 e 15 dias após a infusão (Figura 8B). Apesar da
19 acentuada perda de peso corporal, característica do tratamento com doxorrubicina,, nenhuma
20 morte foi detectada no grupo Dox-15d (dose acumulativa de 18 mg/kg), que recebeu 6mg/kg a
21 cada 5 dias durante 15 dias, e no grupo Dox-20d (dose acumulativa de 16 mg/kg), que
22 recebeu 4mg/kg a cada 5 dias durante 20 dias (Figura 8B).



1

2 **Figura 8-** A) Progressão do peso corporal dos animais e Figura B) Curva de sobrevivência dos
 3 animais. Dox- 10d (n=6): concentração de 6mg/kg em dias alternados durante 10 dias (dose
 4 acumulativa de 24mg/kg); Dox- 15d: concentração de 6mg/kg a cada 4 dias durante 15 dias
 5 (dose acumulativa de 24mg/kg); Dox 15d- 3 doses: concentração de 6mg/kg a cada 5 dias
 6 durante 15 dias (dose acumulativa de 18mg/kg); Dox-20d: concentração de 4mg/kg a cada 5
 7 dias durante 20 dias (dose acumulativa de 16mg/kg).

8

9 *O tratamento com doxorubicina promove atrofia e perda de função muscular.*

10 Depois de definir o esquema de infusão de doxorubicina que mais se aproxima do
 11 tratamento em humanos, buscamos entender se tal esquema seria suficiente para promover
 12 características de sarcopenia e fragilidade nos animais. Para isso a dose de 6mg/kg
 13 administrada a cada 5 dias durante 15 dias (dose acumulativa de 18 mg/kg) foi utilizada. A
 14 Tabela 1 apresenta as características gerais dos animais. O tratamento com três injeções i.p de
 15 6mg/kg de doxorubicina a cada 5 dias durante 15 dias causou perda significativa de peso

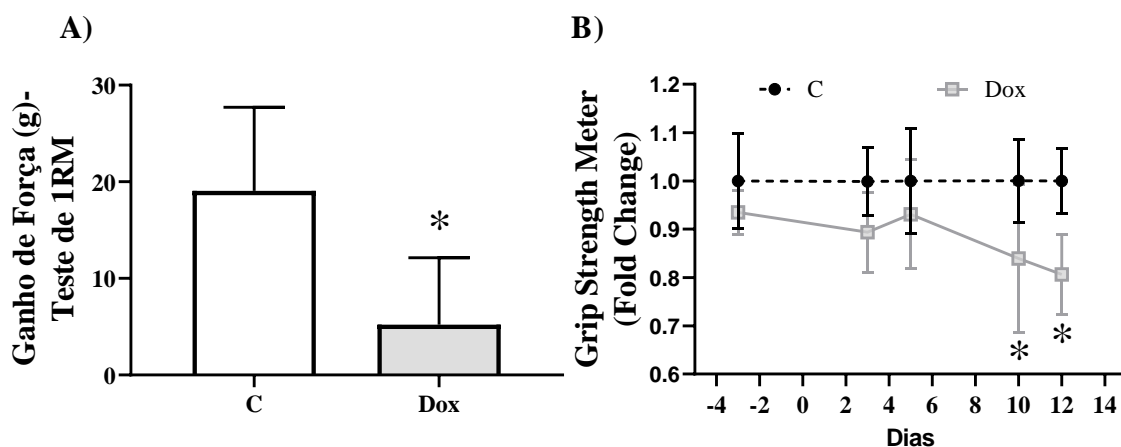
1 corporal (-4,2g; $P < 0,05$), redução da ingestão alimentar, perda de massa muscular cardíaca e
 2 esquelética e redução significativa no peso do baço e do fígado ($P < 0,05$) quando
 3 comparados aos animais controle (Tabela 1).

4 **Tabela 1-** Características Gerais

Grupo	C (n=6)	Dox (n=6)	p-valor
Perda de Peso Corporal (g)	-0,083 ± 0,69	-4,2 ± 1,99	0,0007
Ingestão Alimentar (g)	3,19 ± 0,24	2,11 ± 0,45	0,0001
Coração (mg/mm)	0,6703± 0,07	0,5266± 0,055	0,0002
Baço (mg/mm)	0,35±0,05	0,22±0,03	<0,0001
Fígado (mg/mm)	6,8±1,0	5,8±0,7	0,024
Gastrocnêmio (mg/mm)	0,12±0,01	0,11±0,01	0,0047
Somatória dos músculos (mg/mm)	1,16± 0,10	0,98 ± 0,08	0,0007

5 Dados estão apresentados em média e desvio padrão. Perda de peso corporal foi calculado
 6 subtraindo o peso corporal dos animais ao final do experimento com o peso corporal dos
 7 animais no início do experimento. Valores apresentaram diferença significativa pelo *teste t*
 8 não pareado. C: grupo controle Dox: grupo tratado com 3 injeções i.p de 6mg/kg de
 9 doxorrubicina a cada 5 dias durante 15 dias (dose acumulativa de 18 mg/kg)

10 O tratamento com doxorrubicina promoveu perda de força muscular. Os animais
 11 tratados com doxorrubicina apresentaram 73% ($P < 0,05$) menos força quando comparados ao
 12 grupo C. Enquanto o grupo controle apresentou um aumento de 19g ± 8,6 na carga máxima
 13 do primeiro teste de 1RM para o segundo teste, os animais do grupo Dox tiveram um aumento
 14 de apenas 5g± 6,9 na carga máxima do primeiro teste de 1RM para o segundo teste de 1RM
 15 (Figura 9A). O tratamento com doxorrubicina também promoveu perda da força de tração de
 16 ~20% quando comparada ao grupo Controle ($P < 0,05$), essa perda foi significativa a partir do
 17 décimo dia próximo à terceira injeção de doxorrubicina (Figura 9B).



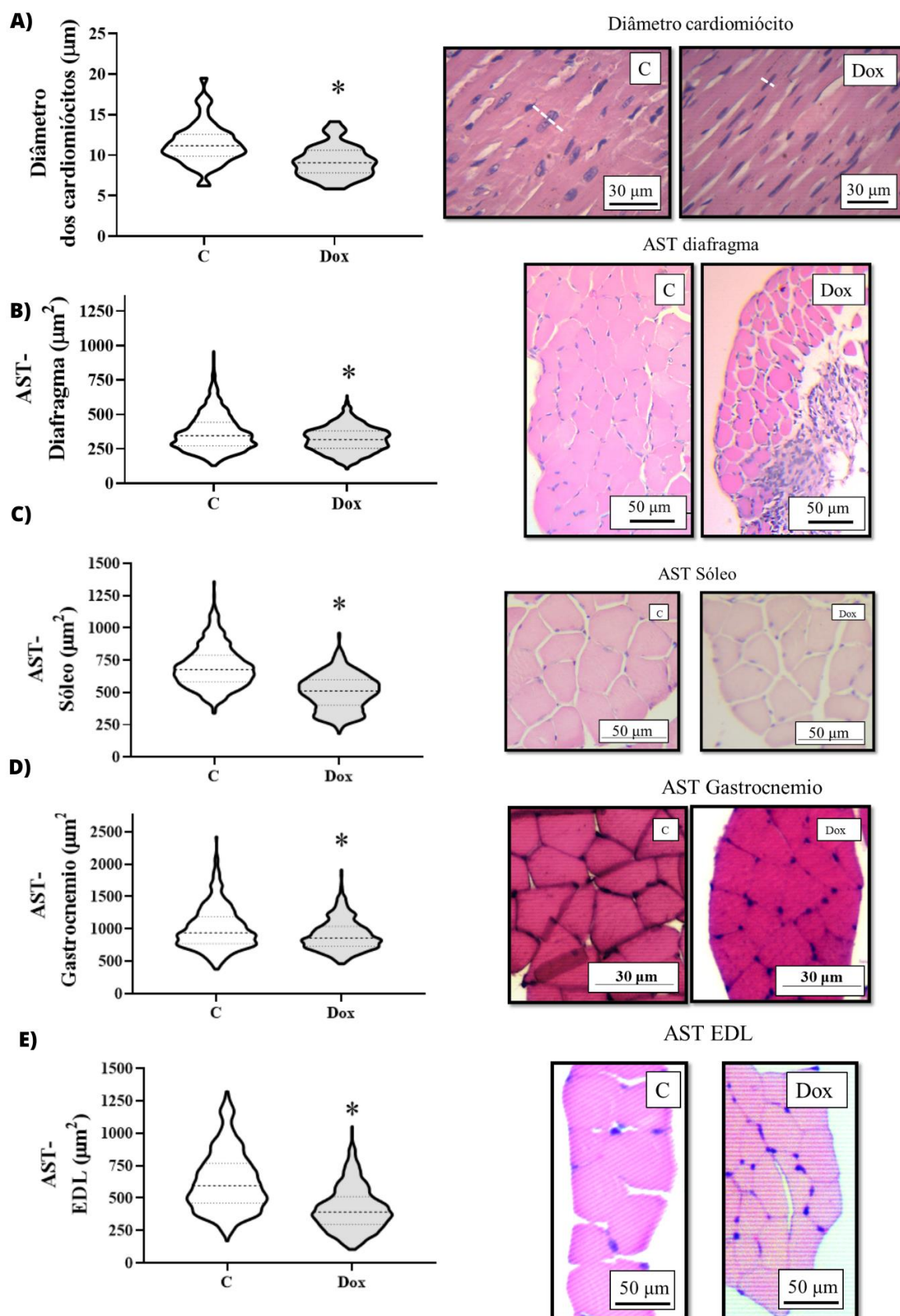
1
2

3 **Figura 9-** Parâmetros de força muscular. A) Ganho de força no Teste de 1RM (uma repetição
4 máxima) na escada B) Progressão do ganho de força pelo teste *Grip strength meter*. Valores
5 estão apresentados em média e desvio padrão. O símbolo * indicia diferença estatística (P
6 $<0,05$) do grupo Dox para o grupo C (gráfico A: test-t não pareado; gráfico B: ANOVA two-
7 way). C: grupo controle Dox: grupo tratado com 3 injeções i.p de 6mg/kg de doxorubicina a
8 cada 5 dias durante 15 dias (dose acumulativa de 18 mg/kg).

9

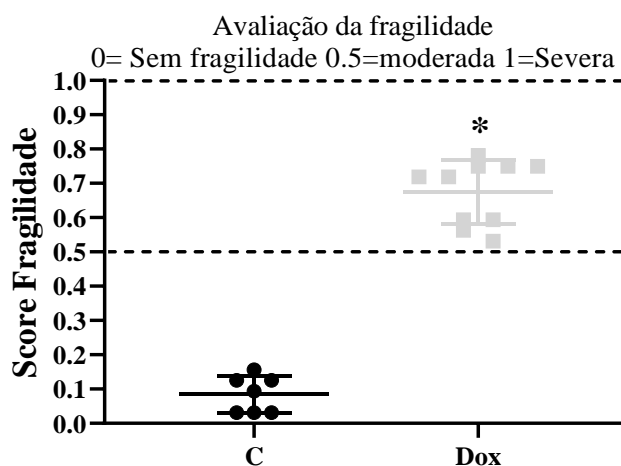
10 O segundo parâmetro definidor de sarcopenia é perda de massa muscular. Para isso foi
11 determinado o diâmetro dos cardiomiócitos e a área de secção transversa dos músculos
12 diafragma, gastrocnêmio, sóleo e EDL. O tratamento com doxorubicina promoveu atrofia
13 cardíaca e muscular em todos os músculos analisados, representando uma redução de 19% no
14 diâmetro dos cardiomiócitos (Figura 10A), 7.8% na área de secção transversa do diafragma
15 (Figura 10B), 10% no gastrocnêmio (Figura 10C), 27.5% no sóleo (Figura 10D) e 34% no
16 EDL (Figura 10E).

17



1 **Figura 10-** Análise da atrofia muscular promovido pelo tratamento com doxorrubicina-
 2 coloração hematoxilina e eosina (A) Diâmetro dos cardiomiócitos e Área de secção transversa
 3 dos músculos (B) diafragma, (C) gastrocnêmio, (D) sóleo e (E) EDL (extensor longo dos
 4 dedos). F) Fotos representativas. Valores estão apresentados em mediana e interquartis. O
 5 símbolo * indicia diferença estatística ($P < 0,05$) do grupo Dox para o grupo C (por Wilcoxon
 6 signed- rank test). AST: área de secção transversa; EDL- extenso longo dos dedos; C: grupo
 7 controle Dox: grupo tratado com 3 injeções i.p de 6mg/kg de doxorrubicina a cada 5 dias
 8 durante 15 dias (dose acumulativa de 18 mg/kg).
 9

10 Outro parâmetro utilizado para analisar a sarcopenia é a performance física, para isso a
 11 performance dos animais foi observada no teste de campo aberto e utilizado um score de
 12 fragilidade para quantificação. Os dados de fragilidade estão apresentados na Figura 11 e na
 13 Tabela 2. O tratamento com doxorrubicina promoveu aumento no escore fragilidade ($P < 0,05$)
 14 quando comparado aos animais do grupo C (C: $0,084 \pm 0,05$; Dox: $0,67 \pm 0,09$). De acordo com
 15 a classificação de fragilidade de Whitehead *et al.*, (2014) onde escore de 0 é definido como
 16 sem fragilidade, um escore de 0,5 definido como uma fragilidade moderada e escore de 1
 17 considera-se fragilidade severa, os animais do grupo Dox foram assim classificados com uma
 18 fragilidade moderada.



19

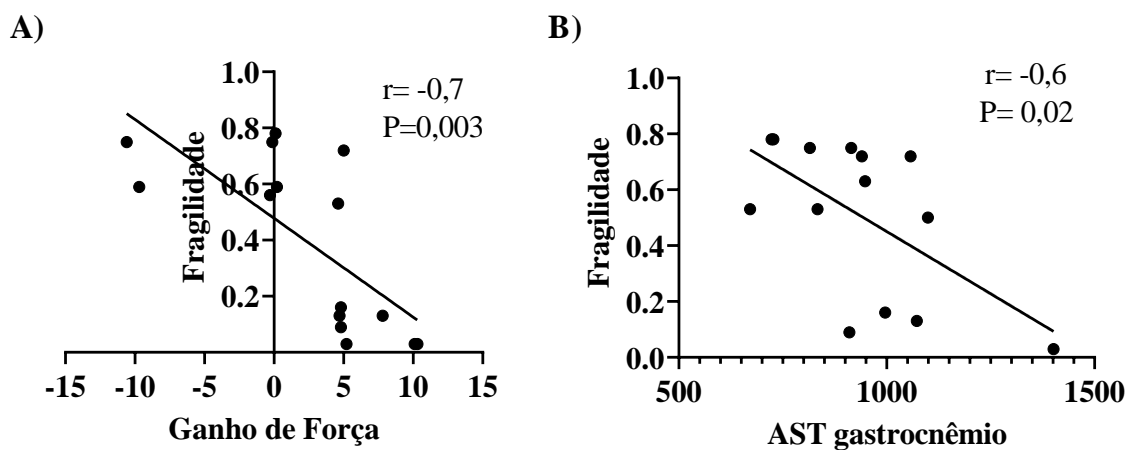
20 **Figura 11-** Tratamento com doxorrubicina promove aumento do escore de Fragilidade.
 21 escore de fragilidade baseado nos 8 parâmetros da tabela 2. Valores estão apresentados em
 22 média e desvio padrão. O símbolo * indicia diferença estatística ($P < 0,05$) do grupo Dox para
 23 o grupo C (por teste *t* independente). C: grupo controle Dox: grupo tratado com 3 injeções i.p
 24 de 6mg/kg de doxorrubicina a cada 5 dias durante 15 dias (dose acumulativa de 18 mg/kg).

1 **Tabela 2-** Parâmetros para análise do escore de fragilidade

	C (n=5)	Dox (n=6)
Peso Corporal (g)	26,0±2,1	22,5±1,5
Tempo em movimento (%)	81,2± 3,2	62,7±9,2
Distância Percorrida (m)	3312,5 ± 222,4	2084,31±540,7
Distância máxima percorrida (m)	183,5± 54,8	114,6± 25,9
Tempo em movimento (s)	243,65 ±9,7	187,95 ± 30,4
<i>Meander</i> (graus)	13± 1,4	24,5±7,8
<i>Rearing</i>	27,9±10,9	16,3±4,0
Velocidade Média (cm/s)	11±0,7	6,9±1,7

2 C: grupo controle Dox: grupo tratado com 3 injeções i.p de 6mg/kg de doxorubicina a cada 5
3 dias durante 15 dias (dose acumulativa de 18 mg/kg). Valores apresentados em média e
4 desvio padrão.

5 A correlação de *Pearson* demonstrou que o escore de fragilidade está inversamente
6 associado ao ganho de força dos animais e diretamente associado a atrofia muscular ($P<0,05$),
7 onde a atrofia foi representada pela área de secção transversa do músculo gastrocnêmio, assim
8 quanto menor a área da fibra maior o escore de fragilidade (Figura 12).



9
10

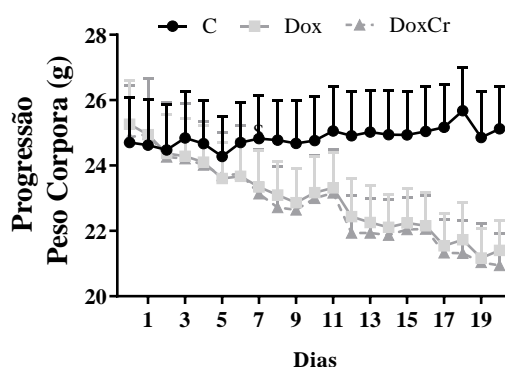
11 **Figura 12-** Correlação entre escore de fragilidade e ganho de força muscular do teste de
12 escalada (A) e área de secção transversa (AST) do gastrocnêmio (B).

13

1 *Suplementação de creatina mitigou a atrofia e perda de força muscular promovido pelo*
 2 *tratamento com doxorubicina*

3 Sabendo que o modelo experimental com ciclos de doxorubicina promoveu atrofia
 4 muscular, perda de força e de função, mais um experimento foi conduzido com o objetivo de
 5 investigar os efeitos da suplementação de creatina sobre esses parâmetros. Com a intenção de
 6 suplementar os animais com 4% de creatina na ração por pelo menos 28 dias, os animais
 7 iniciaram a suplementação de creatina 7 dias antes da infusão com doxorubicina e foram
 8 tratados com 4 injeções (i.p) de doxorubicina a cada 5 dias numa concentração de 4mg/kg
 9 durante 20 dias (dose acumulativa de 16mg/kg). A Figura 13 apresenta a progressão de peso
 10 corporal durante 20 dias. É possível observar que o tratamento com doxorubicina promoveu
 11 perda significativa de peso corporal a partir do sétimo dia. A suplementação de creatina na
 12 ração não promoveu alterações na perda de peso corporal dos animais.

13



14

15 **Figura 13-** Progressão de peso corporal dos animais. Valores apresentados em média e desvio
 16 padrão (C -n=9; Dox e Dox Cr n=10). \$ Diferença dos grupos Dox e DoxCr em relação ao
 17 grupo C do dia 6 até o dia 20 ($P < 0,05$). C: grupo controle; Dox: grupo tratado com 4 injeções
 18 intraperitoneais de 4mg/kg de doxorubicina a cada 5 dias (dose acumulativa de 16 mg/kg);
 19 DoxCr: grupo tratado com 4 injeções intraperitoneais de 4mg/kg de doxorubicina a cada 5
 20 dias (dose acumulativa de 16 mg/kg) e suplementado com creatina na ração (4%).
 21

22 A Tabela 3 apresenta as características gerais dos animais. O tratamento com
 23 doxorubicina provocou perda de massa muscular esquelética (8%) e redução no peso do
 24 fígado quando comparados aos animais do grupo C. A suplementação de creatina não foi
 25 capaz de amenizar a perda de massa muscular esquelética promovida pelo tratamento com
 26 doxorubicina.

1 **Tabela 3-** Características Gerais

	C (n=8)	Dox (n=10)	DoxCr n= (10)
Perda de peso corporal (g)	0,4±0,5	3,9±0,7*	3,9±0,9*
Fígado (mg/mm de tibia)	6,4±0,5	5,4±0,8*	6,0 ±0,8
Creatina livre- fígado (mmol/g de ptn)	0,05±0,03	0,04± 0,01	0,59± 0,12*#
Creatina Total- fígado (mmol/g de ptn)	1,07±0,14	1,18±0,17	1,72±0,19*#
Ck plasmática (U/L)	23039± 1443	25698±3092*	26528±1892*
CKMB (U/L)	3107± 871,1	2903± 651,9	2628±704,3
Σ Músculos (mg/mm de tibia)	1,01±0,1	0,91±0,1*	0,88±0,1*

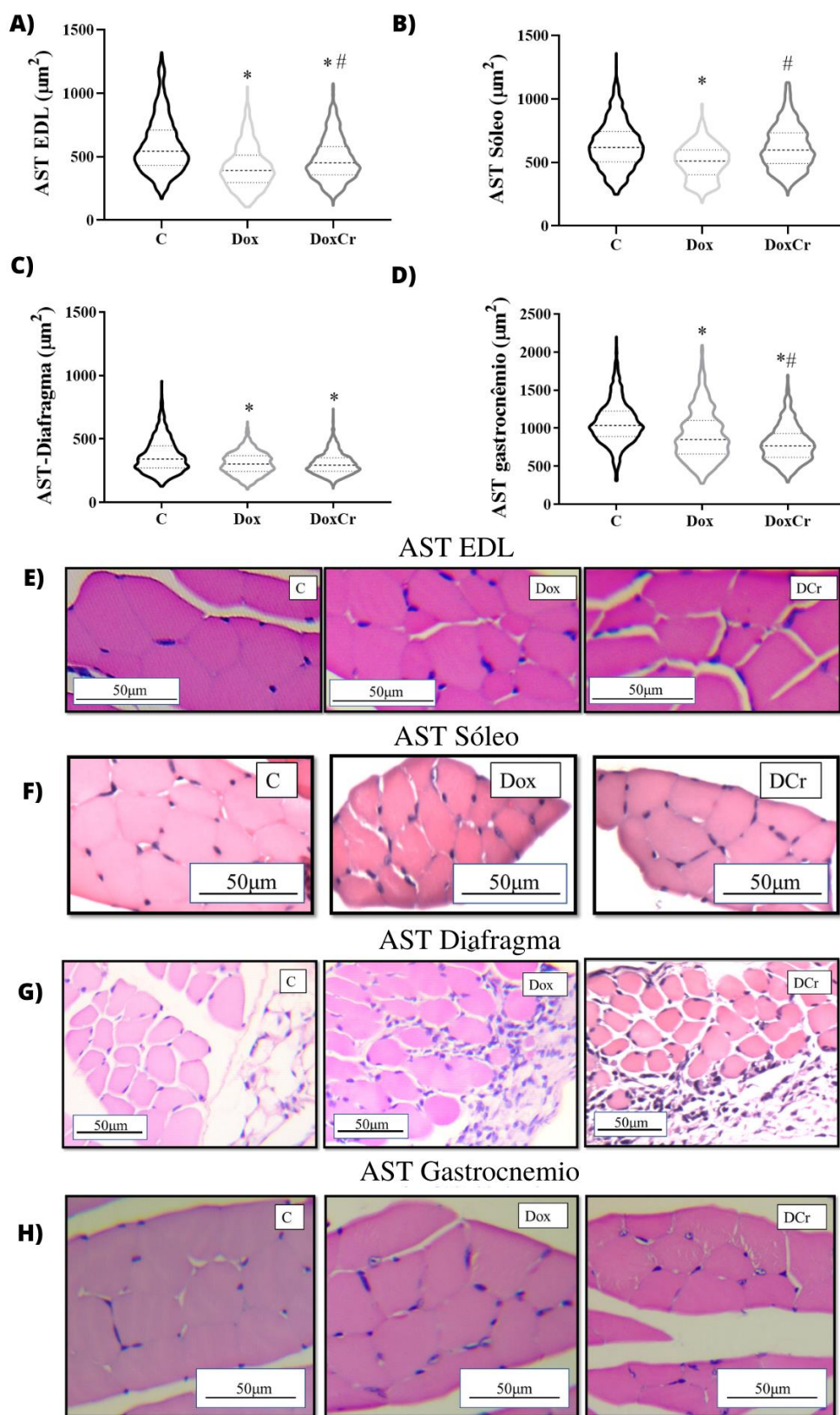
2 *Diferença dos grupos em relação ao grupo controle; # Diferença dos grupos em relação ao
3 grupo Dox ($P < 0,05$). C: grupo controle; Dox: grupo tratado com 4 injeções intraperitoneais
4 de 4mg/kg de doxorubicina a cada 5 dias (dose acumulativa de 16 mg/kg); DoxCr: grupo
5 tratado com 4 injeções intraperitoneais de 4mg/kg de doxorubicina a cada 5 dias (dose
6 acumulativa de 16 mg/kg) e suplementado com creatina na ração (4%); Σ somatória dos
7 músculos Extensor longo dos dedos, Gastrocnêmio, tibial anterior e sóleo. Ck: creatina
8 quinase; ptn: proteína. CKMB: creatina quinase fração MB.

9 A concentração de creatina no fígado está apresentada na Tabela 3. O grupo
10 suplementado com creatina apresentou aumento de 10x na concentração de creatina livre (P
11 $< 0,05$; Figura 18A) e de 55% na creatina comparado aos demais grupos ($P < 0,05$; Tabela 3).

12 A análise da enzima creatina quinase plasmática está presente na Tabela 3, o aumento
13 da atividade de creatina quinase plasmática representa o dano muscular promovido pelo
14 tratamento com doxorubicina (C:23038,8 U/L x Dox:25698 U/L; $P < 0,05$). A isoenzima MB
15 é uma das três formas da enzima creatina quinase e é utilizada para diagnóstico de infarto
16 agudo do miocárdio ou para identificar lesões das células do músculo cardíaco. O tratamento
17 com doxorubicina não promoveu dano nas células do músculo cardíaco de acordo com a
18 dosagem da creatina quinase-MB plasmática (CKMB) (Tabela 3). A suplementação de
19 creatina não foi capaz de diminuir o aumento da concentração de creatina quinase plasmática
20 promovido pelo tratamento com doxorubicina (Tabela 3)

21 As análises da estrutura muscular estão representadas pela AST dos músculos
22 gastrocnêmio, EDL, sóleo e diafragma na Figura 14. O tratamento com doxorubicina

1 promoveu atrofia muscular de ~15% no gastrocnêmio, sóleo e diafragma e de 28% no EDL
2 (Figura 14 A, B, C e D) quando comparada ao grupo C. A suplementação de creatina mitigou
3 a atrofia muscular dos músculos EDL e sóleo (Figura 14A e B), apesar de não alterar a área de
4 secção transversa das fibras do músculo diafragma e agravar a atrofia promovida pelo
5 tratamento com doxorrubicina no músculo gastrocnêmio (Dox: Md de 853 x DoxCr: 764 μm^2)
6 quando comparada ao grupo Dox (Figura 14 C e D).

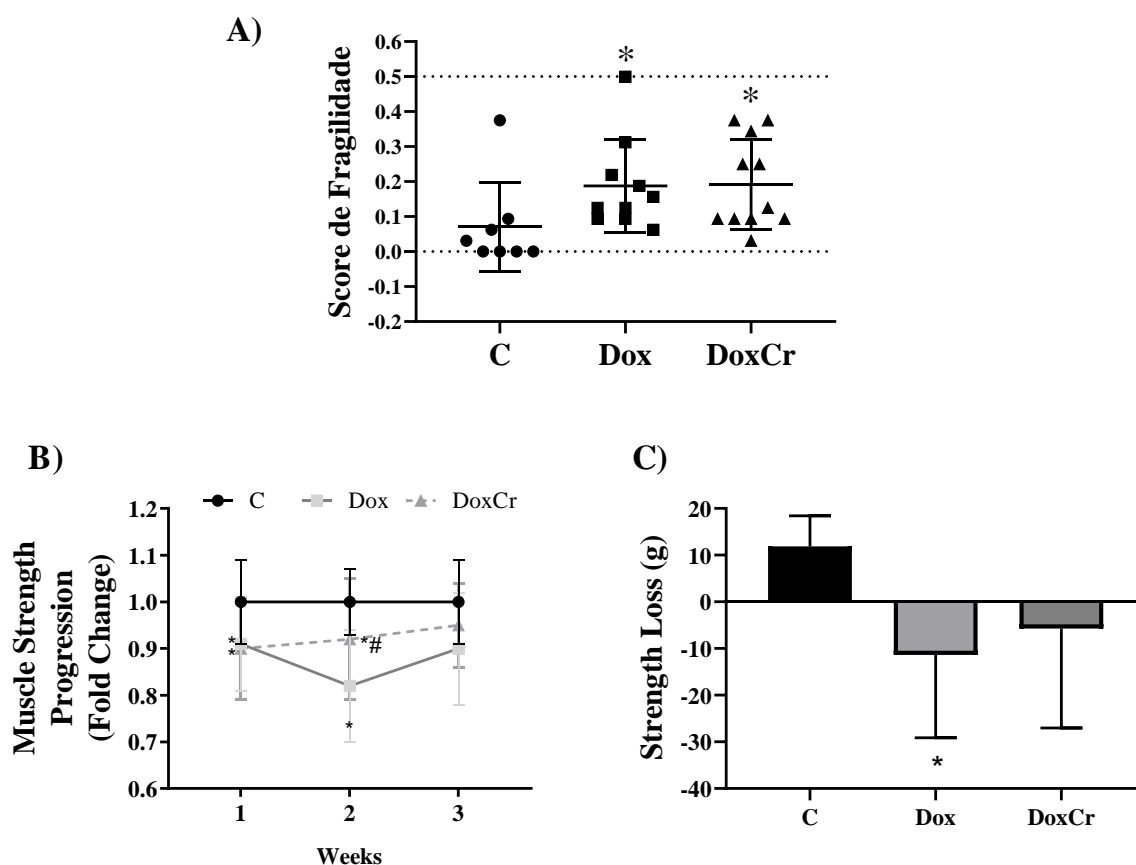


1

2 **Figura 14-** Área de secção transversa dos músculos A) EDL (extensor longo dos dedos) B)
 3 Sóleo C) Diafragma e D) Gastrocnêmio; Fotos representativas E) EDL, F) Sóleo, G)
 4 Diafragma e H) Gastrocnêmio. Dados apresentado em mediana e intervalos interquartis.
 5 *Diferença dos grupos em relação ao grupo C; # Diferença dos grupos em relação ao grupo

1 Dox ($P < 0,05$). AST: área de secção transversa; C: grupo controle; Dox: grupo tratado com 4
 2 injeções intraperitoneais de 4mg/kg de doxorubicina a cada 5 dias (dose acumulativa de 16
 3 mg/kg); DoxCr: grupo tratado com 4 injeções intraperitoneais de 4mg/kg de doxorubicina a
 4 cada 5 dias (dose acumulativa de 16 mg/kg) e suplementado com creatina na ração.
 5

6 Os parâmetros de função muscular estão apresentados na Figura 15. A suplementação
 7 com creatina não foi capaz de amenizar a fragilidade induzida por doxorubicina. O
 8 tratamento com doxorubicina promoveu perda significativa na força dos animais no teste de
 9 1RM e perda de força de tração na primeira e segunda semana (Figura 15B e C). Em
 10 contrapartida a suplementação de creatina preveniu a perda de força determinada pelos dois
 11 testes a partir da segunda semana (Figura 15B).



12
13

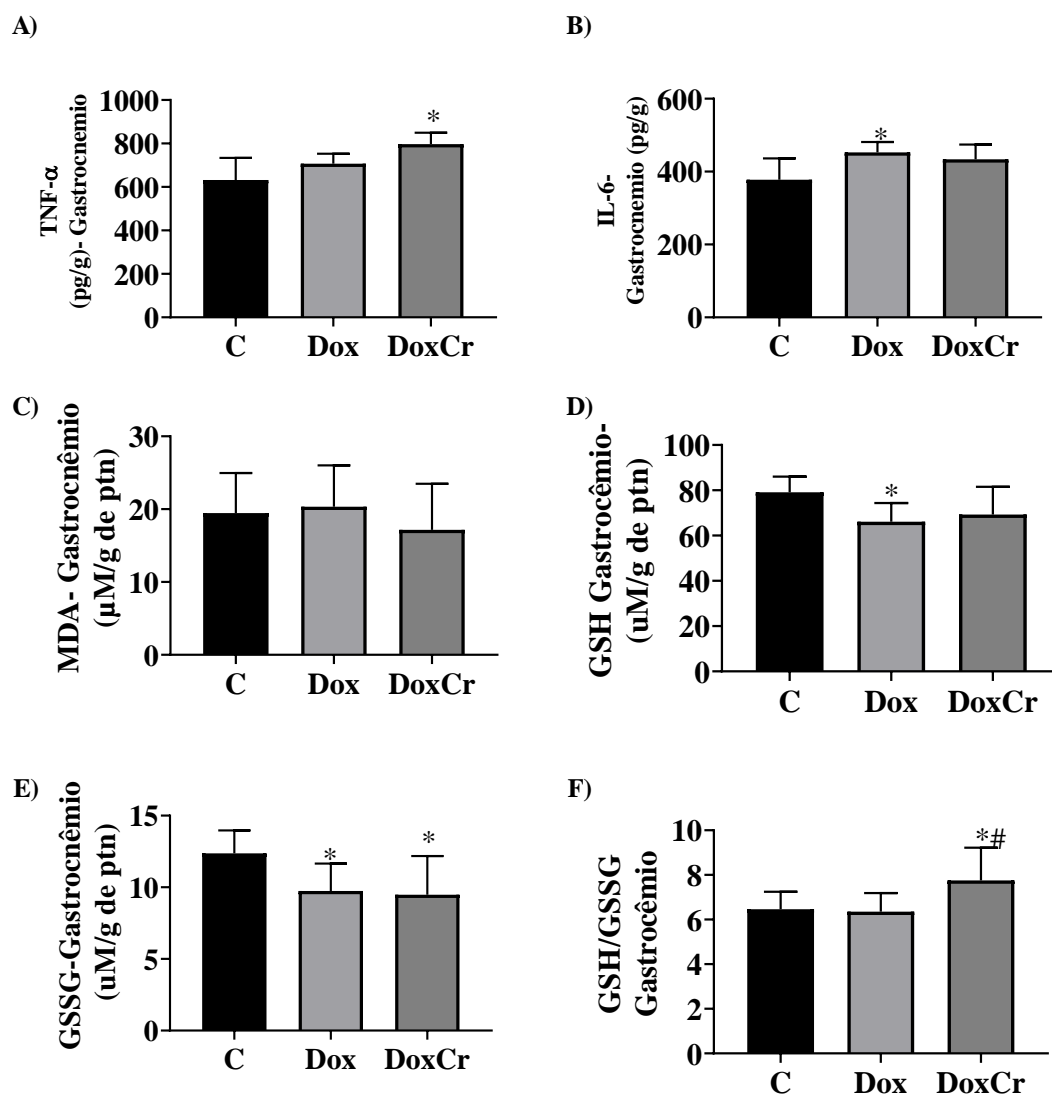
14 **Figura 15-** Parâmetros de fragilidade e de força muscular. (A) escore de fragilidade calculado
 15 pelas variáveis quantificadas pelo teste de campo aberto. B) Grip strenght meter e C) Teste de
 16 1RM realizado na escada. Valores apresentados em média e desvio padrão. *Diferença dos
 17 grupos em relação ao grupo C ($P < 0,05$). # Diferença dos grupos em relação ao grupo Dox. C:
 18 grupo controle; Dox: grupo tratado com 4 injeções intraperitoneais de 4mg/kg de
 19 doxorubicina a cada 5 dias (dose acumulativa de 16 mg/kg); DoxCr: grupo tratado com 4

1 injeções intraperitoneais de 4mg/kg de doxorubicina a cada 5 dias (dose acumulativa de 16
2 mg/kg) e suplementado com creatina na ração; RM: repetição máxima.

3 Alguns marcadores bioquímicos associados à atrofia muscular foram analisados. As
4 citocinas TNF- α e IL-6 então apresentadas na Figura 16 A e B. O tratamento com
5 doxorubicina aumentou em ~20% os níveis de IL-6 quando comparado ao grupo controle
6 (C:377,9 \pm 58; Dox:452,9 \pm 28) e nenhuma alteração foi encontrada nos níveis de TNF- α .
7 (Figura 16 A e B). A suplementação de creatina mitigou o aumento dos níveis de IL-6, porém
8 os animais suplementados com creatina tiveram um aumento de 15% nos níveis de TNF- α
9 quando comparado ao grupo C (C: 377,9 \pm 58; DoxCr: 433,6 \pm 40,7; Figura 16 A e B).

10 O MDA, GSH, GSSG e razão GSH/GSSG foram analisados como parâmetros de
11 estresse oxidativo e estão representados na Figura 16. Nenhuma alteração foi encontrada na
12 lipoperoxidação, caracterizada pelos níveis de MDA, porém foi encontrado redução nos níveis
13 de GSH e GSSG nos camundongos tratados com doxorubicina (Figura 16 C, D, E e F).
14 Contudo, ao analisar a razão GSH/GSSG nenhuma alteração foi promovida pelo tratamento
15 com doxorubicina. A suplementação de creatina aumentou os níveis da razão GSH/GSSG
16 (Figura 16 F).

17



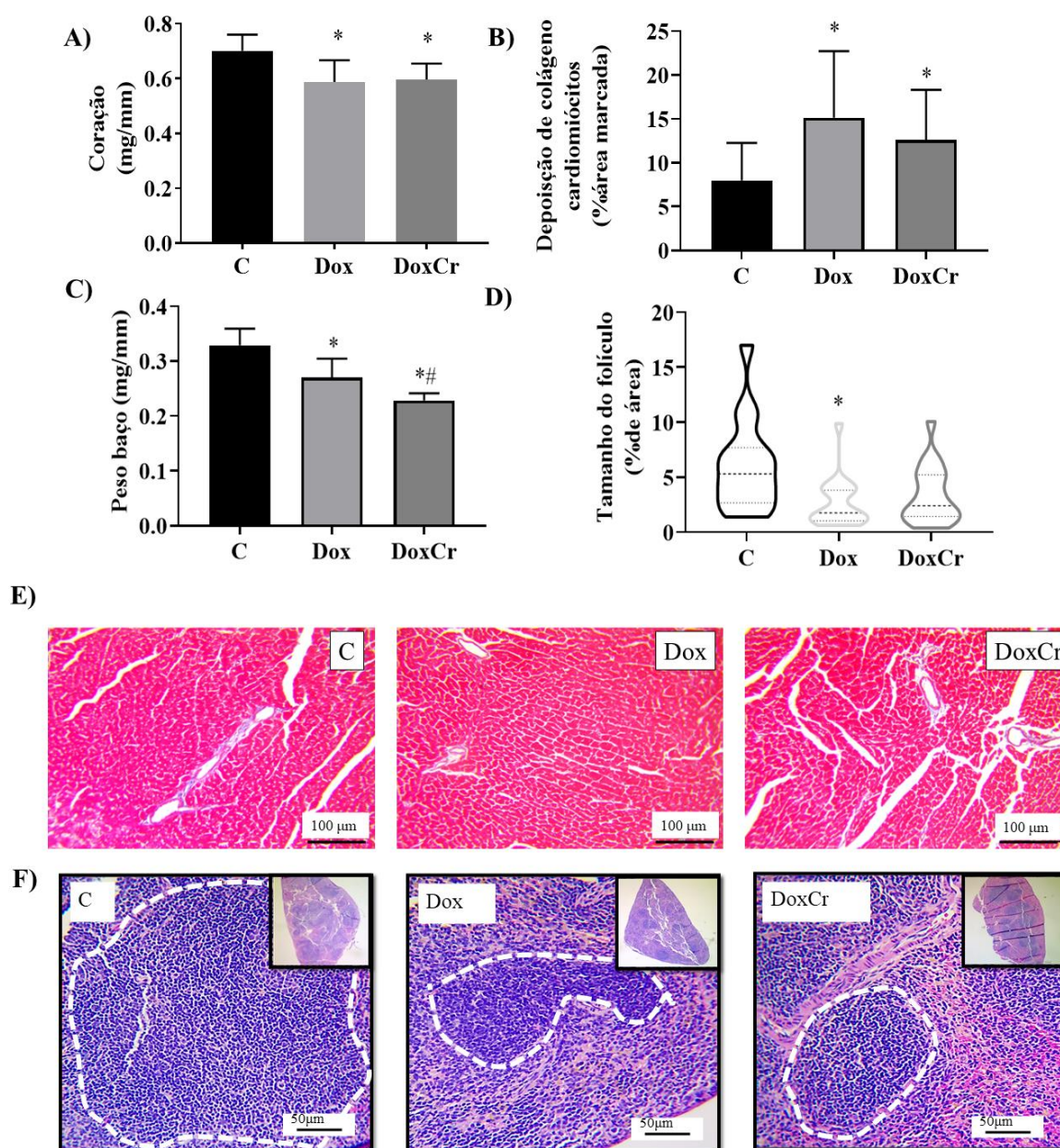
1

2 **Figura 16-** Concentração de citocinas no músculo gastrocnêmio A) TNF-alfa, B) IL-6 e
 3 marcadores de estresse oxidativo C) MDA, D) GSH, E) GSSG e F) GSH/GSSG. *Diferença
 4 dos grupos em relação ao grupo C; # Diferença dos grupos em relação ao grupo Dox (P
 5 $<0,05$). C: grupo controle; Dox: grupo tratado com 4 injeções intraperitoneais de 4mg/kg de
 6 doxorubicina a cada 5 dias (dose acumulativa de 16 mg/kg); DoxCr: grupo tratado com 4
 7 injeções intraperitoneais de 4mg/kg de doxorubicina a cada 5 dias (dose acumulativa de 16
 8 mg/kg) e suplementado com creatina na ração.

9

10 Como análise de cardiotoxicidade, o peso do coração e a quantidade de colágeno
 11 foram analisados e estão apresentados na Figura 17**Erro! Fonte de referência não**
 12 **encontrada..** O tratamento com doxorubicina provocou redução significativa no peso
 13 coração (23%). A porcentagem de colágeno foi de 7.9 % no grupo C e de 15.1% no grupo
 14 Dox, o que mostra que os animais tratados com doxorubicina apresentaram maior deposição
 15 de colágeno no interstício dos cardiomiócitos (Figura 17B). A suplementação de creatina não

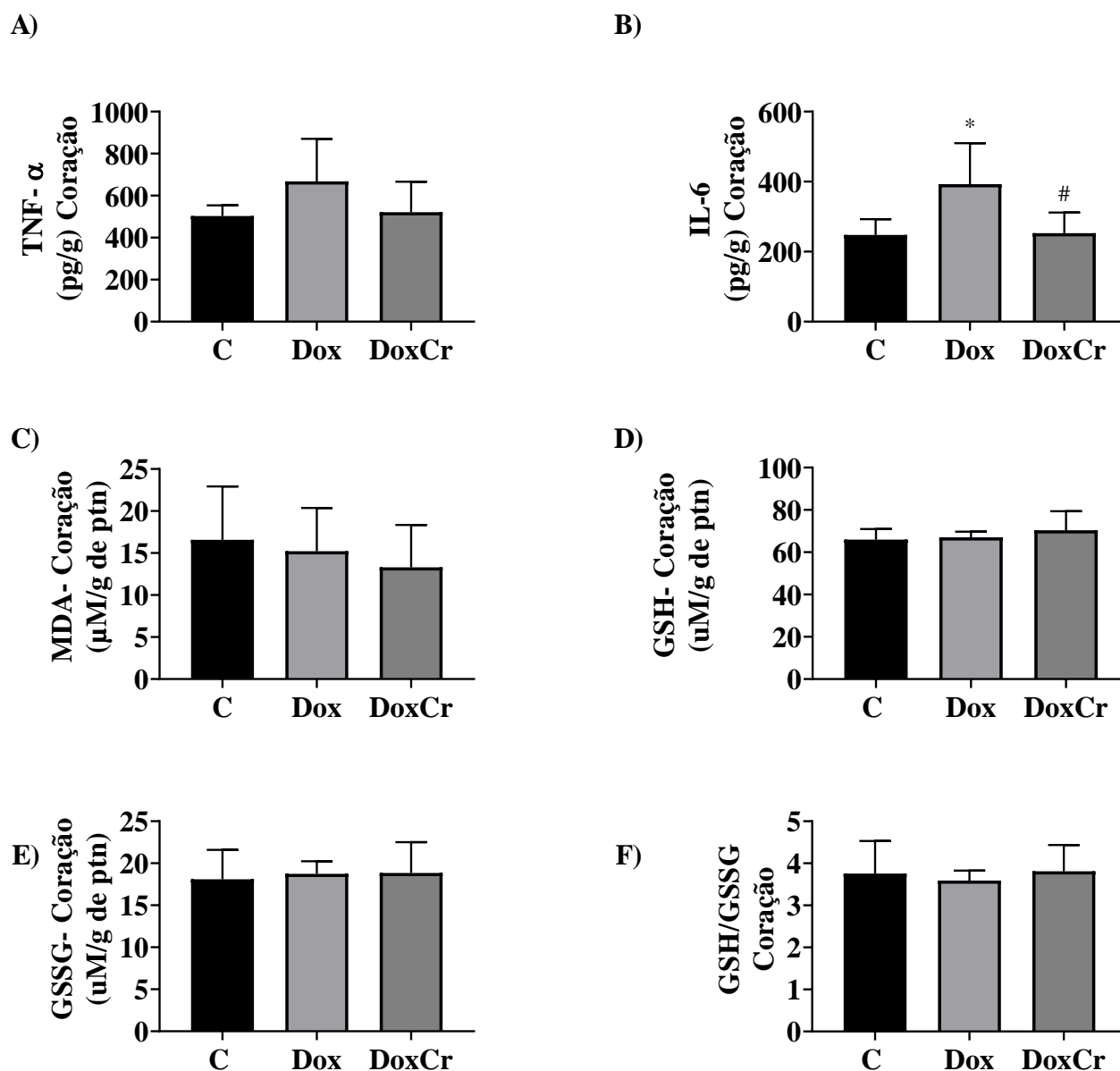
1 foi capaz de amenizar a perda de peso do coração nem o aumento da deposição de colágeno
 2 promovido pelo tratamento com doxorrubicina (C: $7,9\% \pm 4,2$; DCr: $12,63\% \pm 5,7$; Figura
 3 17B). Em conjunto a esses resultados, o baço também sofreu atrofia significativa induzida
 4 pelo tratamento com doxorrubicina e redução da área dos folículos linfoides (Figura 17 C e
 5 D). Os animais suplementados com creatina apresentaram redução mais acentuada no peso do
 6 baço, porém a suplementação de creatina foi capaz de mitigar a redução do folículo induzida
 7 pelo tratamento com doxorrubicina (Figura 17C e D).



8
 9 **Figura 17-** Parâmetros de caquexia esplenocardiaca. A) Peso do coração corrigido pelo
 10 comprimento da tíbia B) Deposição de colágeno nos cardiomiócitos marcado pela coloração
 11 tricrômico de Masson; C) Peso do baço corrigido pelo comprimento da tíbia; D) Tamanho dos
 12 folículos marcado pela coloração com Hemataxilina e eosina. Valores apresentados em média e

1 desvio padrão. *Diferença dos grupos em relação ao grupo C ($P < 0,05$). C: grupo controle; Dox:
2 grupo tratado com 4 injeções intraperitoneais de 4mg/kg de doxorubicina a cada 5 dias (dose
3 acumulativa de 16 mg/kg); DoxCr: grupo tratado com 4 injeções intraperitoneais de 4mg/kg
4 de doxorubicina a cada 5 dias (dose acumulativa de 16 mg/kg) e suplementado com creatina
5 na ração.
6

7 As citocinas inflamatórias e marcadores de estresse oxidativo também foram avaliados
8 no músculo cardíaco (Figura 18). Os níveis de IL-6 sofreram aumento significativo de ~59%,
9 nos camundongos tratados com doxorubicina, porém nenhuma alteração foi encontrada nos
10 níveis de TNF- α (Figura 18A e B). Não houve alteração em nenhum dos marcadores de
11 estresse oxidativo analisados no músculo cardíaco. A suplementação de creatina reduziu
12 significativamente os níveis de IL-6 em 36% (Figura 18B).



1
2

3 **Figura 18-** Concentração de citocinas no coração A) TNF-alfa, B) IL-6 e marcadores de
 4 estresse oxidativo C) MDA, D) GSH, E) GSSG e F) GSH/GSSG. *Diferença dos grupos em
 5 relação ao grupo C; # Diferença dos grupos em relação ao grupo Dox ($P < 0,05$). C: grupo
 6 controle; Dox: grupo tratado com 4 injeções intraperitoneais de 4mg/kg de doxorubicina a
 7 cada 5 dias (dose acumulativa de 16 mg/kg); DoxCr: grupo tratado com 4 injeções
 8 intraperitoneais de 4mg/kg de doxorubicina a cada 5 dias (dose acumulativa de 16 mg/kg) e
 9 suplementado com creatina na ração. MDA: malondialdeído. GSH: glutatona; GSSG:
 10 glutatona dissulfeto.

11

12

1 7 DISCUSSÃO

2 O objetivo desse trabalho foi analisar o efeito do tratamento com doxorubicina em
3 ciclos, sobre os principais moderadores da sarcopenia, atrofia, perda de força e de função
4 física e o efeito da suplementação de creatina sobre a perda de força e função causada pelos
5 ciclos de doxorubicina. Os principais resultados deste trabalho são 1) três doses de 6mg/kg
6 (18mg/kg) ministradas a cada cinco dias é um modelo animal compatível com o tratamento
7 utilizado para pacientes e útil para se estudar a perda de massa muscular, força e função. 2) A
8 suplementação com creatina mitigou parcialmente os efeitos colaterais induzidos pelo
9 tratamento com ciclos de doxorubicina, como a perda de força muscular em dois diferentes
10 tipos de músculo, o sóleo com características mais aeróbicas e o EDL com características
11 mais glicolíticas e ainda reduziu significativamente os níveis de IL-6 no coração.

12 Esses achados são relevantes pois a suplementação de creatina é de fácil acesso, com
13 custo relativamente baixo e pode ser introduzida na rotina dos pacientes sem grandes
14 dificuldades (SAKKAS; SCHAMBELAN; MULLIGAN, 2009). Nossos resultados são
15 relevantes pois é escasso na literatura tratamentos efetivos para prevenir ou atenuar a
16 toxicidade muscular a miopatia induzida pelo tratamento com doxorubicina. Diminuir a
17 toxicidade e a disfunção muscular durante o tratamento quimioterápico é importante porque a
18 perda acentuada de massa muscular e disfunções musculares estão associadas ao aumento da
19 mortalidade e da hospitalização em pacientes com câncer (ANJANAPPA *et al.*, 2020;
20 MORISHITA, 2016; TREJO-AVILA *et al.*, 2021; WANG *et al.*, 2013; WEYMANN;
21 WOOD; MARKS, 2014).

22 Os resultados serão discutidos com mais detalhes na sequência.

23 *O tratamento com doxorubicina apresenta características compatíveis com o*
24 *tratamento de pacientes oncológicos e promove alterações no músculo esquelético*

25 Considerando que grande parte do tratamento com quimioterápicos como as
26 antraciclina são realizado em ciclos, este estudo teve como objetivo apresentar um modelo
27 animal compatível com o utilizado no tratamento em humanos (HORTOBAGYI *et al.*, 1988;
28 VINCENT *et al.*, 2013). O tempo entre as infusões de antraciclina (ciclos) permite que o
29 paciente se recupere da toxicidade provocada pelo tratamento, reduzindo os efeitos colaterais
30 e melhorando a qualidade de vida dos pacientes e ao mesmo tempo é efetivo para a redução
31 do tumor (CARDINALE; IACOPO; CIPOLLA, 2020; HORTOBAGYI *et al.*, 1988;
32 VINCENT *et al.*, 2013; WEYMANN; WOOD; MARKS, 2014). Os ciclos que utilizamos
33 neste estudo (três doses de 6mg/kg a cada cinco dias ou quatro doses de 4 mg/kg a cada cinco

1 dias) apresentam características gerais próximas às encontradas nos pacientes, como perda de
2 peso corporal, disfunção muscular, cardiotoxicidade sem causar morte nos animais
3 (WEYMANN; WOOD; MARKS, 2014).

4 Não há protocolos para analisar a sarcopenia em animais, assim, alguns estudos tem
5 utilizados os testes físicos como teste de campo aberto, Grip Strength Meter, testes de força
6 específica, entre outros testes como parâmetro para analisar força e função muscular em
7 protocolos com animais, além de escores de fragilidade para animais (MANN, A.;
8 CHESSELET, 2015; WHITEHEAD *et al.*, 2014; YORKE *et al.*, 2017). A perda de peso
9 corporal e de massa muscular podem impactar na força muscular e em parâmetros funcionais
10 que podem servir como orientação para analisar a sarcopenia (CHEN, J. A. *et al.*, 2015). No
11 teste de campo aberto realizado nesse estudo, foi possível observar que os animais tratados
12 com três doses de 18 mg/kg apresentavam menor capacidade de explorar o ambiente,
13 caracterizado pelo menor tempo em movimento, menor distância percorrida e menor
14 velocidade média, além de menor número de *rearing* e maior número de *meander* (mudanças
15 de direção). Segundo Whitehead *et al.*, (2014), esses dados juntamente com o peso corporal
16 dos animais definem *score* para estudar a fragilidade em animais, sugerindo que animais
17 tratados com doxorrubicina apresentam um *score* moderado para fragilidade, por
18 apresentarem um *score* igual ou superior a 0,5 enquanto que um *score* de 1,0 é considerado
19 como fragilidade severa. E ainda, encontramos correlação negativa de 0,7 e de 0,6,
20 respectivamente, entre o *score* de fragilidade e a perda de força e o *score* de fragilidade e a
21 AST do músculo gastrocnêmio, mostrando que animais mais frágeis apresentam menor força
22 e atrofia muscular.

23 Para avaliar a função locomotora e o padrão de sono em camundongos tratados com
24 doxorrubicina, LIRA *et al.*, (2016) utilizaram dose aguda de doxorrubicina (15mg/kg) e
25 analisaram os efeitos 48h depois da injeção. Como resultado, os animais tratados com
26 doxorrubicina exploraram menos a área do teste de campo aberto, resultado obtido da análise
27 de um menor número de cruzamento do centro da área do teste e devido a menor número de
28 *rearing* realizado pelos animais do grupo tratado com doxorrubicina (LIRA *et al.*, 2016). Os
29 resultados do nosso estudo complementam os encontrados por LIRA (2016), mostrando que
30 não apenas uma dose aguda mas também doses repetidas de doxorrubicina interferem na
31 exploração dos animais.

1 Em conjunto a esses resultados, o tratamento com doxorubicina promoveu menor
2 ganho de força no teste de escalada e perda de força de preensão manual a partir da segunda
3 dose de 6 mg/kg. Na literatura existem apenas estudos mostrando perda de força específica
4 em doses agudas de doxorubicina (HIENSCH *et al.*, 2020) no diafragma (dose aguda de
5 20mg/kg) (GILLIAM *et al.*, 2011b; MIN *et al.*, 2015), no EDL (dose aguda de 15mg/kg e de
6 20mg/kg) (GILLIAM *et al.*, 2009; HYDOCK *et al.*, 2011) e no sóleo (dose aguda de 12,5
7 mg/kg e 15mg/kg) (HYDOCK *et al.*, 2011). O estudo de Torok; busekrus; hydock, (2019) foi
8 o único encontrado na literatura que avaliou a perda de força num modelo *in vivo* e
9 encontraram redução da força de preensão manual em ratos após 5 dias do tratamento com
10 dose aguda de 15 mg/kg de doxorubicina. Entretanto, este é o primeiro estudo avaliando a
11 força muscular ao longo de ciclos de tratamento com doxorubicina. Esses dados são novos e
12 pioneiros e, futuramente podem servir de base para estudar mecanismos e estratégias para
13 amenizar os efeitos colaterais promovidos pela doxorubicina.

14 A perda de função sugerida pelo aumento da fragilidade dos animais tratados com
15 doxorubicina está correlacionado com a atrofia muscular induzida pelo tratamento e podem
16 ser parcialmente explicadas pelo aumento nos níveis de IL-6 no tecido muscular. A literatura
17 mostra que o uso de quimioterápicos está relacionado com o aumento nos níveis de IL-6
18 plasmática, tanto em modelos pré-clínicos (com combinação de ciclofosfamida, doxorubicina
19 e 5-FU) como em pacientes com câncer gastrointestinal durante o tratamento com
20 capecitabina e radioterapia (ELSEA; KNEISS; WOOD, 2015; WANG *et al.*, 2013;
21 WEYMANN; WOOD; MARKS, 2014). O aumento de IL-6 foi relacionada com a fadiga
22 relatada pelos pacientes com câncer e com alteração na atividade locomotora de animais
23 (BLUTHÉ *et al.*, 2000; ELSEA; KNEISS; WOOD, 2015; WANG *et al.*, 2013; WEYMANN;
24 WOOD; MARKS, 2014). Devido à dificuldade de estudar a fadiga em modelos animais, os
25 mecanismos pelos quais a IL-6 está ligada a fadiga ainda são desconhecidos (WANG *et al.*,
26 2013). Para tentar entender o aumento nos níveis de IL-6 com a atividade a composição
27 corporal e função Bluthé *et al.*, (2000) administraram lipopolissacarídeo indutor de citocinas
28 (LPS) e observou que animais IL-6^{-/-} passaram mais tempo explorando a área enquanto IL-6^{+/+}
29 que receberam LPS exploraram menos (pelo teste de campo aberto) e foram mais afetados
30 pelo tratamento com LPS do que os animais IL-6^{-/-}. Em contrapartida, Elsea; Kneiss; Wood,
31 (2015) utilizaram camundongos IL-6^{-/-} os quais receberam injeções com ciclofosfamida-
32 doxorubicina-5-fluorouracil e perceberam que os camundongos sem IL-6 quase não
33 perderam massa magra e gordura quando comparado ao camundongos selvagens que

1 receberam ciclosfamida-doxorrubicina-5-fluorouracil, mas não encontraram alteração na ação
2 locomotora (corrida na roda) dos camundongos.

3 *O tratamento com ciclos de doxorubicina promove alterações no músculo cardíaco*

4 Partindo da ideia de HYDOCK *et al.*, (2011) de que a perda de força muscular
5 específica causada pelo tratamento com doxorubicina é uma interação entre os efeitos diretos
6 no músculo esquelético (como alteração morfológica, enzimática e do fluxo de cálcio) e dos
7 efeitos indiretos de disfunções cardíacas (atrofia, aumento da deposição de colágeno e perda
8 de função), os sintomas como fadiga e pior qualidade de vida relatados pelos pacientes
9 submetidos ao tratamento quimioterápico devem ser considerados levando em consideração
10 tanto as alterações cardiovasculares como musculares (CARDINALE; IACOPO; CIPOLLA,
11 2020).

12 Com relação às alterações cardiovasculares, já está claro na literatura que o tratamento
13 com doxorubicina promove redução do peso do coração, perda de função cardíaca
14 (encurtamento do ventrículo esquerdo, alteração no fluxo sanguíneo mitral e aórtico), atrofia
15 dos cardiomiócitos, ativação de vias proteolíticas, estresse oxidativo entre outras alterações
16 (CARDINALE; IACOPO; CIPOLLA, 2020; HYDOCK *et al.*, 2011; WILLIS *et al.*, 2019).
17 Neste estudo, observamos que o tratamento com doxorubicina promoveu atrofia dos
18 cardiomiócitos, aumento de IL-6 e uma maior deposição de colágeno, caracterizando dano
19 muscular cardíaco. De acordo com os estudos de HYDOCK *et al.*, (2011) e JADAPALLI *et*
20 *al.*, (2018) as alterações na estrutura e na função cardíaca dos ratos parecem estar relacionadas
21 com danos nos parâmetros funcionais do músculo esquelético, ou seja, uma mesma dose de
22 doxorubicina promove uma redução de ~54% e de 60% na força muscular específica do
23 músculo EDL e sóleo, respectivamente, enquanto na função cardíaca a redução é de ~25%
24 fração de ejeção e de ~45% na velocidade máxima do fluxo sanguíneo aórtico (HYDOCK *et*
25 *al.*, 2011; JADAPALLI *et al.*, 2018). Assim, apesar das células cardíacas serem mais
26 sensíveis e afetadas a ação da doxorubicina do que as células do músculo esquelético,
27 segundo HYDOCK *et al.*,(2011) a função do músculo esquelético acaba sendo mais afetada
28 do que as funções cardíacas.

29 Assim, como as alterações cardíacas estão relacionadas com a perda de função no
30 músculo esquelético estas parecem também estar associada a atrofia do baço (JADAPALLI *et*
31 *al.*, 2018). Nosso estudo mostrou uma redução significativa no peso do baço e dos seus

1 folículos provocada pelo tratamento com doxorrubicina (Figura 17), que em conjunto aos
2 resultados encontrados na histologia do coração, sugerem uma toxicidade esplenocárdica.
3 Esses resultados estão de acordo com os encontrados em estudos prévios que mostraram
4 redução do peso do baço induzido pelo tratamento com doxorubicina (3 doses de 7mg/kg com
5 infusão a cada 7 dias) e isso interfere negativamente na resposta imune afetando o
6 funcionamento das enzimas COX (ciclooxigenase) e LOX (lipoxigenase) causando
7 imunossupressão (JADAPALLI *et al.*, 2018). Os leucócitos do baço são capazes de detectar
8 lesão cardíaca ou acidente cardiovascular periférico, assim o processo de fibrose é iniciado e
9 como consequência desse fenômeno de depuração e resolução da lesão pode ocorrer
10 insuficiência cardíaca (JADAPALLI *et al.*, 2018; LIU, C. *et al.*, 2021).

11 Essas alterações relacionadas a resposta imune e cardiotoxicidade são
12 complementadas quando analisados os níveis de IL-6 no coração dos animais tratados com
13 doxorubicina neste estudo. O aumento de citocinas inflamatórias em doenças cardíacas, como
14 insuficiência cardíaca já é conhecido, porém o aumento de IL-6 no tecido cardíaco induzido
15 pela administração de doxorrubicina é controverso (MANN, D. L., 2002; NIU *et al.*, 2009).

16 *A suplementação com creatina mitigou a perda de força e atrofia muscular promovido*
17 *pelo tratamento com doxorrubicina*

18 A importância da doxorrubicina no tratamento do câncer é indiscutível. Se por um lado os
19 efeitos benéficos da doxorrubicina contra o tumor reduziram a mortalidade por câncer de
20 mama para cerca de 10%, por outro lado, esse aumento da sobrevivência dos pacientes aumentou
21 significativamente a incidência dos efeitos colaterais do quimioterápico (CARRASCO *et al.*,
22 2020; SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2017, 2018). Por essa razão, conhecendo a importância
23 da doxorrubicina no tratamento do câncer, a busca por estratégias que amenizem os efeitos
24 colaterais da doxorrubicina devem ser investigadas com o objetivo de fornecer uma melhor
25 qualidade de vida e evitar a interrupção do tratamento. Como a principal hipótese da
26 toxicidade muscular induzida pela doxorrubicina é derivada do aumento exacerbado da
27 produção de ERO muitos antioxidantes como vitamina C, E, extrato de polifenol da uva,
28 ácido chicórico, ácido docosahexaenóico (DHA), carvedilol, L-carnitina, coenzima Q-10 entre
29 outros já foram testados buscando alternativas para amenizar os efeitos colaterais do
30 tratamento com doxorrubicina (CARRASCO *et al.*, 2020; JABŁOŃSKA-TRYPUC *et al.*,
31 2018; SERGAZY *et al.*, 2020; VINCENT *et al.*, 2013). Assim, a suplementação de creatina

1 foi considerada como alternativa nesse estudo não somente por sua ação antioxidante (direta
2 e indireta), mas também devido aos seus efeitos pleotróficos, e devido a isso, a suplementação
3 com creatina deve ser considerada como estratégia para retardar a sarcopenia
4 (CORDINGLEY; CORNISH; CANDOW, 2022; GUESCINI *et al.*, 2017).

5 Alguns estudos já mostraram o potencial da creatina em modelo animal em reduzir o
6 tamanho do tumor, amenizar a perda de massa corporal, diminuir o estresse oxidativo causado
7 pelo tumor, atuar como anti-inflamatório através da redução de citocinas inflamatórias (TNF-
8 α e IL-6), promover alterações morfológicas no baço (diminuiu o tamanho do fólculo do
9 baço), aumentar a imunidade das células T anti-tumorais e prevenir o aumento de genes
10 chaves da atrofia muscular induzida pelo tumor (Atrogin-1 e Murf-1), e ainda quando
11 utilizada em conjunto a outras substâncias (metilglioxal e ácido ascórbico) aumentou a
12 sobrevivência dos animais com tumor (CAMPOS-FERRAZ *et al.*, 2014, 2016; CELLA *et al.*,
13 2019, 2020; CORDINGLEY; CORNISH; CANDOW, 2022; DEMINICE *et al.*, 2016; DI
14 BIASE *et al.*, 2019; PAL; ROY; RAY, 2016; PATRA *et al.*, 2012). Entretanto pouco se sabe
15 sobre o uso dos quimioterápicos, em especial da doxorubicina, em conjunto a suplementação
16 de creatina. Partindo da ideia de que uma das formas de utilizar a suplementação de creatina
17 no tratamento do tumor é em conjunto com o tratamento quimioterápico é fundamental
18 estudar os possíveis riscos e benefícios da suplementação de creatina diante os efeitos
19 colaterais do tratamento com doxorubicina antes de ofertá-la para paciente em fase de
20 tratamento.

21 Os resultados da suplementação de creatina sobre a força muscular encontrados nesse
22 estudo são promissores e complementam os resultados encontrados em modelo *ex vivo* em
23 estudos prévios. A suplementação de creatina retardou a perda de força muscular induzida
24 pelo tratamento com doxorubicina como podemos observar na progressão de força dos
25 animais e na carga carregada pelos animais no teste da escalada. No estudo BRED AHL;
26 HYDOCK, (2017) a suplementação de creatina protegeu o músculo EDL e sóleo contra a
27 redução da produção de força máxima induzida pelo tratamento agudo de 20 mg/kg de
28 doxorubicina em modelo *ex vivo* (BRED AHL; HYDOCK, 2017).

29 Esses resultados em conjunto com os dados de atrofia muscular presentes nesse estudo,
30 em que a suplementação de creatina mitigou a atrofia muscular do músculo sóleo e EDL
31 sugerem um efeito protetor da suplementação de creatina na toxicidade do músculo
32 esquelético induzido pelo tratamento com doxorubicina que reflete na força dos animais. No
33 presente estudo foi encontrado um aumento na GSH/GSSG, o que sugere melhora na

1 capacidade antioxidante no músculo, entretanto os mecanismos que podem estar por de trás
2 dessa proteção permanecem desconhecidos.

3 A literatura apresenta diversos efeitos protetores da suplementação de creatina contra
4 disfunções musculares principalmente através da capacidade da suplementação em aumentar a
5 reserva de PCr favorecendo a oferta de ATP (BREDAHL *et al.*, 2020; BREDAHL;
6 HYDOCK, 2017). Para os músculos glicolíticos, como no músculo EDL, a principal
7 especulação é de que uma maior disponibilidade energética na célula, devido ao aumento da
8 reserva de PCr pela suplementação de creatina, faz com que o músculo demore mais para
9 entrar em fadiga (BREDAHL; HYDOCK, 2017). Enquanto nos músculos aeróbicos, como no
10 sóleo, a suplementação de creatina exerce efeitos na Ck mitocondrial (mtCK), enzima essa
11 responsável em catalisar o ATP sintetizado na mitocôndria e a creatina do citosol para
12 regenerar PCr no sarcoplasma (BREDAHL; HYDOCK, 2017). Tokarska-schlattner,
13 Wallimann e Schlattner, (2002) mostraram que o tratamento com doxorrubicina prejudica a
14 função da enzima mtCK. E ainda, estudos em cultura de célula realizados em cardiomiócitos
15 demonstraram que o tratamento com doxorrubicina atrapalha a reciclagem de ADP pela PCr,
16 o transporte de creatina e altera a cinética da enzima creatina quinase, sendo esses mais alguns
17 dos mecanismos pelo qual a doxorrubicina promove aumento da produção de ERO e
18 consequente disfunção mitocondrial (BREDAHL *et al.*, 2020; SESTILI *et al.*, 2016;
19 TOKARSKA-SCHLATTNER *et al.*, 2006, 2007).

20 Dessa forma, sabendo que a doxorrubicina provoca disfunções mitocondriais e atrapalha o
21 metabolismo aeróbico, o aumento da reserva de PCr fornecido pela suplementação de creatina
22 pode vir a ser uma saída para suprir as necessidades energéticas da célula e amenizar a atrofia
23 muscular induzida pelo tratamento com doxorrubicina (BREDAHL *et al.*, 2020; BREDAHL;
24 HYDOCK, 2017; SESTILI *et al.*, 2016; TOKARSKA-SCHLATTNER *et al.*, 2006, 2007).

25 Outro resultado que merece destaque nesse estudo são os níveis de IL-6 encontrados no
26 coração e depleção linfóide no baço. Esses resultados estão relacionados com a resposta anti-
27 inflamatória da suplementação de creatina que muitos estudos já têm descrito. Cordingley,
28 Cornish e Candow (2022) apresentaram uma série de situações (modelos de artrite e
29 osteoartrite, câncer, inflamações hepáticas, modelos de exercício, entre outras condições) as
30 quais a suplementação de creatina foi efetiva em diminuir marcadores inflamatórios, porém
31 mais estudos para compreender os mecanismos pelos quais a creatina consegue exercer essa
32 função são necessários.

1 **8 LIMITAÇÕES**

2 Algumas limitações do trabalho devem ser consideradas. O presente estudo não representa
3 um cenário clínico uma vez que apenas pessoas com câncer fazem uso da doxorrubicina, e
4 existem interações importantes que devem ser consideradas quando estudado um modelo
5 animal com tumor e um animal saudável recebendo quimioterapia. Para conseguirmos
6 compreender se os efeitos da suplementação de creatina amenizando a perda de força e atrofia
7 muscular são realmente compensadores, devido principalmente sua ação nas citocinas e baço
8 é necessário um estudo com modelo de tumor para observar se a suplementação de creatina
9 não impede ou atrasa o efeito da doxorrubicina nas células tumorais, uma vez que o
10 mecanismo de ataque da doxorrubina nas células tumorais é através da imunossupressão.

11 Uma vez que a pesquisa experimental deve servir como base para estudos com humanos,
12 muitos estudos devem ser conduzidos antes desses achados serem levados para humanos.
13 Como perspectivas futuras, deve-se pensar também no uso da suplementação de creatina após
14 o fim dos ciclos de quimioterápicos. O principal foco do estudo foi investigar os mecanismos
15 pelo qual os ciclos de doxorrubicina podem prejudicar a função física e o músculo esquelético
16 dos animais e se a suplementação de creatina exerce alguma interação com a doxorrubicina,
17 uma vez que a literatura apresenta em sua maioria estudos com dose aguda avaliando esses
18 aspectos e o tratamento na prática clínica é comumente realizado em ciclos que duram meses.
19 Por fim, o trabalho carece de análises de função cardíaca de forma a conseguir avaliar melhor
20 os efeitos da suplementação de creatina nas funções cardíacas, mas contribui para a literatura
21 quando destacados os testes de força e função muscular, devido à escassez de estudos
22 analisando essas variáveis em modelos animais.

23

1 9 CONCLUSÕES

2 A utilização de ciclos de 6 mg/kg a cada 5 dias (dose acumulativa de 18 mg/kg) de
3 doxorubicina é compatível com o tratamento em pacientes oncológicos onde há significativa
4 perda de massa corporal e consequentes disfunções físicas, caracterizadas principalmente pela
5 atrofia do músculo esquelético e cardíaco, perda de força e de função, sendo esses os
6 principais definidores da sarcopenia e fragilidade.

7 A suplementação de creatina mitigou a perda de força, atrofia muscular promovida
8 pela doxorubicina, além de apresentar ação anti-inflamatória no músculo cardíaco assim, a
9 suplementação de creatina pode ser uma estratégia para amenizar a toxicidade muscular
10 induzida pelo tratamento com doxorubicina, porém mais estudos são necessários.

11

12

13

14

15

16

17

18

1 REFERÊNCIAS

- 2 ABDEL-AZIZ, Y. I.; KARARA, H. M. Direct linear transformation from comparator
3 coordinates into object space coordinates in close-range photogrammetry. **Photogrammetric**
4 **Engineering and Remote Sensing**, [s. l.], v. 81, n. 2, p. 103–107, 2015. Available at:
5 <https://doi.org/10.14358/PERS.81.2.103>
- 6 ALJOBAILY, N. *et al.* Creatine alleviates doxorubicin-induced liver damage by inhibiting
7 liver fibrosis, inflammation, oxidative stress, and cellular senescence. **Nutrients**, [s. l.], v. 13,
8 n. 1, p. 1–15, 2021. Available at: <https://doi.org/10.3390/nu13010041>
- 9 AMERICAN CANCER SOCIETY. **Cancer Treatment & Survivorship Facts & Figures**
10 **2016-2017**. [S. l.], 2016. Available at: <https://doi.org/10.1063/1.2936924>.
- 11 ANJANAPPA, M. *et al.* Sarcopenia in cancer: Risking more than muscle loss. **Technical**
12 **Innovations and Patient Support in Radiation Oncology**, [s. l.], v. 16, p. 50–57, 2020.
13 Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tipsro.2020.10.001>
- 14 ARAZI, H.; EGHBALI, E.; SUZUKI, K. Creatine supplementation, physical exercise and
15 oxidative stress markers: A review of the mechanisms and effectiveness. **Nutrients**, [s. l.], v.
16 13, n. 3, p. 1–17, 2021. Available at: <https://doi.org/10.3390/nu13030869>
- 17 BASSIT, R. A.; CURI, R.; COSTA ROSA, L. F. B. P. Creatine supplementation reduces
18 plasma levels of pro-inflammatory cytokines and PGE2 after a half-ironman competition.
19 **Amino Acids**, [s. l.], v. 35, n. 2, p. 425–431, 2008. Available at:
20 <https://doi.org/10.1007/s00726-007-0582-4>
- 21 BAUER, J. *et al.* Sarcopenia: A Time for Action. An SCWD Position Paper. **Journal of**
22 **Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, [s. l.], v. 10, n. 5, p. 956–961, 2019. Available at:
23 <https://doi.org/10.1002/jcsm.12483>
- 24 BLUTHÉ, R. *et al.* Role of IL-6 in cytokine-induced sickness behavior : a study with IL-6
25 deficient mice. [s. l.], v. 70, p. 367–373, 2000.
- 26 BOLTON, J. L.; DUNLAP, T. Formation and Biological Targets of Quinones: Cytotoxic

- 1 versus Cytoprotective Effects. **Chemical Research in Toxicology**, [*s. l.*], v. 30, n. Figure 1, p.
2 13–37, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.6b00256>
- 3 BOZZETTI, F. Chemotherapy-Induced Sarcopenia. **Current Treatment Options in**
4 **Oncology**, [*s. l.*], v. 21, n. 1, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11864-019-0691-9>
- 5 BREDAHL, E. C. *et al.* Effects of Exercise on Doxorubicin-Induced Skeletal Muscle
6 Dysfunction. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, [*s. l.*], v. 48, n. 8, p. 1468–
7 1473, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1249/MSS.0000000000000926>
- 8 BREDAHL, E. C. *et al.* Use of Creatine and Creatinine to Minimize Doxorubicin-Induced
9 Cytotoxicity in Cardiac and Skeletal Muscle Myoblasts. **Nutrition and Cancer**, [*s. l.*], v. 0, n.
10 0, p. 1–8, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1080/01635581.2020.1842893>
- 11 BREDAHL, E. C.; BUSEKRUS, R. B.; HYDOCK, D. S. The combined effect of creatine and
12 resistance training on doxorubicin-induced muscle dysfunction. **Nutrition and Cancer**, [*s. l.*],
13 v. 72, n. 6, p. 939–947, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1080/01635581.2019.1670852>
- 14 BREDAHL, E. C.; HYDOCK, D. S. Creatine Supplementation and Doxorubicin-Induced
15 Skeletal Muscle Dysfunction: An Ex Vivo Investigation. **Nutrition and Cancer**, [*s. l.*], v. 69,
16 n. 4, p. 607–615, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1080/01635581.2017.1295089>
- 17 CAMPOS-FERRAZ, P. L. *et al.* An overview of amines as nutritional supplements to
18 counteract cancer cachexia. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, [*s. l.*], v. 5, n. 2,
19 p. 105–110, 2014. Available at: <https://doi.org/10.1007/s13539-014-0138-x>
- 20 CAMPOS-FERRAZ, P. L. *et al.* Exploratory studies of the potential anti-cancer effects of
21 creatine. **Amino Acids**, [*s. l.*], v. 48, n. 8, p. 1993–2001, 2016. Available at:
22 <https://doi.org/10.1007/s00726-016-2180-9>
- 23 CANDOW, D. G. *et al.* Effectiveness of Creatine Supplementation on Aging Muscle and
24 Bone: Focus on Falls Prevention and Inflammation. **Journal of Clinical Medicine**, [*s. l.*], v.
25 8, n. 4, p. 488–503, 2019. Available at: <https://doi.org/10.3390/jcm8040488>

- 1 CARDINALE, D.; IACOPO, F.; CIPOLLA, C. M. Cardiotoxicity of Anthracyclines.
2 **frontiers in cardiovascular medicine**, [s. l.], v. 7, n. March, p. 3–5, 2020. Available at:
3 <https://doi.org/10.3389/fcvm.2020.00026>
- 4 CARRASCO, R. *et al.* Prevention of doxorubicin-induced Cardiotoxicity by pharmacological
5 non-hypoxic myocardial preconditioning based on Docosahexaenoic Acid (DHA) and
6 carvedilol direct antioxidant effects: Study protocol for a pilot, randomized, double-blind,
7 controlled trial. **Trials**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 1–10, 2020. Available at:
8 <https://doi.org/10.1186/s13063-019-3963-6>
- 9 CARVALHO, C. *et al.* Doxorubicin : The Good , the Bad and the Ugly Effect. **Current**
10 **Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 16, p. 3267–3285, 2009.
- 11 CARVER, J. R.; SZALDA, D.; KY, B. Asymptomatic cardiac toxicity in long-term cancer
12 survivors: Defining the population and recommendations for surveillance. **Seminars in**
13 **Oncology**, [s. l.], v. 40, n. 2, p. 229–238, 2013. Available at:
14 <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2013.01.005>
- 15 CELLA, P. S. *et al.* Creatine supplementation does not promote tumor growth or enhance
16 tumor aggressiveness in Walker-256 tumor-bearing rats. [s. l.], v. 80, 2020. Available at:
17 <https://doi.org/10.1016/j.nut.2020.110958>
- 18 CELLA, P. S. *et al.* Creatine supplementation in Walker-256 tumor-bearing rats prevents
19 skeletal muscle atrophy by attenuating systemic inflammation and protein degradation
20 signaling. **European Journal of Nutrition**, [s. l.], 2019. Available at:
21 <https://doi.org/10.1007/s00394-019-01933-6>
- 22 CHEN, C. *et al.* Autophagy and Doxorubicin resistance in cancer. **Anti-Cancer Drugs**, [s. l.],
23 v. 29, n. 1, p. 1–9, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1097/CAD.0000000000000572>
- 24 CHEN, J. A. *et al.* Ghrelin prevents tumour- and cisplatin-induced muscle wasting:
25 characterization of multiple mechanisms involved. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and**
26 **Muscle**, [s. l.], n. April, p. 132–143, 2015. Available at: <https://doi.org/10.1002/jcsm.12023>

- 1 COLLARD, R. M. *et al.* Prevalence of frailty in community-dwelling older persons: A
2 systematic review. **Journal of the American Geriatrics Society**, [s. l.], v. 60, n. 8, p. 1487–
3 1492, 2012. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1532-5415.2012.04054.x>
- 4 CORDINGLEY, D. M.; CORNISH, S. M.; CANDOW, D. G. Anti-Inflammatory and Anti-
5 Catabolic Effects of Creatine Supplementation: A Brief Review. **Nutrients**, [s. l.], v. 14, n.
6 544, p. 1–11, 2022.
- 7 CRUZ-JENTOFT, A. J. *et al.* Sarcopenia: Revised European consensus on definition and
8 diagnosis. **Age and Ageing**, [s. l.], v. 48, n. 1, p. 16–31, 2019. Available at:
9 <https://doi.org/10.1093/ageing/afy169>
- 10 D'LUGOS, A. C. *et al.* Chronic doxorubicin administration impacts satellite cell and capillary
11 abundance in a muscle-specific manner. **Physiological Reports**, [s. l.], v. 7, n. 7, p. 1–13,
12 2019. Available at: <https://doi.org/10.14814/phy2.14052>
- 13 DE LIMA, E. A. *et al.* Aerobic exercise, but not metformin, prevents reduction of muscular
14 performance by AMPk activation in mice on doxorubicin chemotherapy. **Journal of Cellular**
15 **Physiology**, [s. l.], v. 233, n. 12, p. 9652–9662, 2016. Available at:
16 <https://doi.org/10.1002/jcp.26880>
- 17 DE MOOR, J. S. *et al.* Cancer survivors in the united states: Prevalence across the
18 survivorship trajectory and implications for care. **Cancer Epidemiology Biomarkers and**
19 **Prevention**, [s. l.], v. 22, n. 4, p. 561–570, 2013. Available at: [https://doi.org/10.1158/1055-](https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-12-1356)
20 [9965.EPI-12-1356](https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-12-1356)
- 21 DEMINICE, R. *et al.* Creatine supplementation prevents hyperhomocysteinemia, oxidative
22 stress and cancer-induced cachexia progression in Walker-256 tumor-bearing rats. **Amino**
23 **Acids**, [s. l.], v. 48, n. 8, p. 2015–2024, 2016. Available at: [https://doi.org/10.1007/s00726-](https://doi.org/10.1007/s00726-016-2172-9)
24 [016-2172-9](https://doi.org/10.1007/s00726-016-2172-9)
- 25 DEMINICE, R. *et al.* Effects of creatine supplementation on homocysteine levels and lipid
26 peroxidation in rats. **British Journal of Nutrition**, [s. l.], v. 102, n. 1, p. 110–116, 2009.
27 Available at: <https://doi.org/10.1017/S0007114508162985>

- 1 DEMINICE, R.; JORDAO, A. A. Creatine supplementation reduces oxidative stress
2 biomarkers after acute exercise in rats. **Amino Acids**, [s. l.], v. 43, n. 2, p. 709–715, 2012.
3 Available at: <https://doi.org/10.1007/s00726-011-1121-x>
- 4 DENARD, B.; LEE, C.; YE, J. Doxorubicin blocks proliferation of cancer cells through
5 proteolytic activation of. **eLife**, [s. l.], v. 1, p. 1–14, 2012. Available at:
6 <https://doi.org/10.7554/eLife.00090>
- 7 DI, C. *et al.* Are the Absorption Spectra of Doxorubicin Properly Described by Considering
8 Different Tautomers? **Journal of Chemical Information and Modeling**, [s. l.], v. 60, p.
9 513–521, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.9b00785>
- 10 DI BIASE, S. *et al.* Creatine uptake regulates CD8 T cell antitumor immunity. **Journal of**
11 **Experimental Medicine**, [s. l.], v. 216, n. 12, p. 2869–2882, 2019. Available at:
12 <https://doi.org/10.1084/jem.20182044>
- 13 DIET, H. *et al.* Creatine Supplementation Prevents the Accumulation of Fat in the Livers of
14 Rats Fed. [s. l.], 2011. Available at: <https://doi.org/10.3945/jn.111.144857.enzyme>
- 15 DOERR, V. *et al.* Prevention of doxorubicin-induced autophagy attenuates oxidative stress
16 and skeletal muscle dysfunction. **Antioxidants**, [s. l.], v. 9, n. 3, p. 1–16, 2020. Available at:
17 <https://doi.org/10.3390/antiox9030263>
- 18 DOS SANTOS, C. *et al.* Mechanisms of chronic muscle wasting and dysfunction after an
19 intensive care unit stay: A pilot study. **American Journal of Respiratory and Critical Care**
20 **Medicine**, [s. l.], v. 194, p. 821–830, 2016. Available at:
21 <https://doi.org/10.1164/rccm.201512-2344OC>
- 22 ELSEA, C. R.; KNEISS, J. A.; WOOD, L. J. Induction of IL-6 by Cytotoxic Chemotherapy Is
23 Associated With Loss of Lean Body and Fat Mass in Tumor-free Female Mice. **Biological**
24 **Research for Nursing**, [s. l.], v. 17, n. 5, p. 549–557, 2015. Available at:
25 <https://doi.org/10.1177/1099800414558087>
- 26 FIMOIGNARI, C. *et al.* Protective effect of creatine against RNA damage. **Mutation**

- 1 **Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, [s. l.], v. 670, n. 1–
2 2, p. 59–67, 2009. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2009.07.005>
- 3 FONSECA, H. *et al.* Physical inactivity is a major contributor to ovariectomy-induced
4 sarcopenia. **International Journal of Sports Medicine**, [s. l.], v. 33, n. 4, p. 268–278, 2012.
5 Available at: <https://doi.org/10.1055/s-0031-1297953>
- 6 GANZ, P. A. *et al.* Late cardiac effects of adjuvant chemotherapy in breast cancer survivors
7 treated on Southwest Oncology Group protocol S8897. **Journal of Clinical Oncology**, [s. l.],
8 v. 26, n. 8, p. 1223–1230, 2008. Available at: <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.11.8877>
- 9 GENSOUS, N. *et al.* Age-related DNA methylation changes: Potential impact on skeletal
10 muscle aging in humans. **Frontiers in Physiology**, [s. l.], v. 10, n. 996, 2019. Available at:
11 <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00996>
- 12 GILLIAM, L. A. A. *et al.* Doxorubicin acts through tumor necrosis factor receptor subtype 1
13 to cause dysfunction of murine skeletal muscle. [s. l.], p. 1935–1942, 2009. Available at:
14 <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00776.2009>.
- 15 GILLIAM, L. A. A. *et al.* Doxorubicin causes diaphragm weakness in murine models of
16 cancer chemotherapy. **Muscle and Nerve**, [s. l.], v. 43, p. 94–102, 2011a. Available at:
17 <https://doi.org/10.1002/mus.21809>
- 18 GILLIAM, L. A. A. *et al.* TNF / TNFR1 signaling mediates doxorubicin-induced diaphragm
19 weakness. [s. l.], n. 19, p. 225–231, 2011b. Available at:
20 <https://doi.org/10.1152/ajplung.00264.2010>.
- 21 GILLIAM, L. A. A.; ST. CLAIR, D. K. Chemotherapy-induced weakness and fatigue in
22 skeletal muscle: The role of oxidative stress. **Antioxidants and Redox Signaling**, [s. l.], v.
23 15, n. 9, p. 2543–2563, 2011. Available at: <https://doi.org/10.1089/ars.2011.3965>
- 24 GOFFART, S.; VON KLEIST-RETZOW, J. C.; WIESNER, R. J. Regulation of
25 mitochondrial proliferation in the heart: Power-plant failure contributes to cardiac failure in
26 hypertrophy. **Cardiovascular Research**, [s. l.], v. 64, n. 2, p. 198–207, 2004. Available at:

- 1 <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2004.06.030>
- 2 GOUSPILLOU, G. *et al.* Anthracycline-containing chemotherapy causes long-term
3 impairment of mitochondrial respiration and increased reactive oxygen species release in
4 skeletal muscle. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 5, p. 1–10, 2015. Available at:
5 <https://doi.org/10.1038/srep08717>
- 6 GUALANO, B. *et al.* In sickness and in health: The widespread application of creatine
7 supplementation. **Amino Acids**, [s. l.], v. 43, n. 2, p. 519–529, 2012. Available at:
8 <https://doi.org/10.1007/s00726-011-1132-7>
- 9 GUESCINI, M. *et al.* The Combination of Physical Exercise with Muscle-Directed
10 Antioxidants to Counteract Sarcopenia: A Biomedical Rationale for Pleiotropic Treatment
11 with Creatine and Coenzyme Q10. [s. l.], v. 2017, 2017. Available at:
12 <https://doi.org/10.1155/2017/7083049>
- 13 GUIDI, C. *et al.* Differential effect of creatine on oxidatively-injured mitochondrial and
14 nuclear DNA. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, [s. l.], v. 1780, n. 1, p.
15 16–26, 2008. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2007.09.018>
- 16 GUVEN, C.; SEVGILER, Y. Mitochondrial Dysfunction Associated with Doxorubicin
17 Doxorubicin. *In*: TASKIN, E. (Nigde O. H. U. (org.)). **Mitochondrial diseases**. [S. l.: s. n.],
18 2018. p. 323–360. Available at: <https://doi.org/10.5772/intechopen.80284>
- 19 HAO, Q. *et al.* The role of frailty in predicting mortality and readmission in older adults in
20 acute care wards: a prospective study. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 1–8, 2019.
21 Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-38072-7>
- 22 HARMON, K. K. *et al.* The application of creatine supplementation in medical rehabilitation.
23 **Nutrients**, [s. l.], v. 13, n. 6, p. 1–24, 2021. Available at: <https://doi.org/10.3390/nu13061825>
- 24 HAYWARD, R. *et al.* Tissue retention of doxorubicin and its effects on cardiac, smooth, and
25 skeletal muscle function. **Journal of Physiology and Biochemistry**, [s. l.], v. 69, n. 2, p.
26 177–187, 2013. Available at: <https://doi.org/10.1007/s13105-012-0200-0>

- 1 HESPEL, P. *et al.* Oral creatine supplementation facilitates the rehabilitation of disuse
2 atrophy and alters the expression of muscle myogenic factors in human. **Journal of**
3 **Physiology**, [s. l.], v. 536, n. 2, p. 625–633, 2001. Available at:
4 <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2001.0625c.xd>
- 5 HIENSCH, A. E. *et al.* Doxorubicin-induced skeletal muscle atrophy Elucidating the
6 underlying molecular pathways.pdf. **Acta physiologica**, [s. l.], v. 229, 2020. Available at:
7 <https://doi.org/10.1111/apha.13400>
- 8 HORTOBAGYI, G. N. *et al.* Decreased Cardiac Toxicity of Doxorubicin Administered by
9 Continuous Intravenous Infusion in Combination Chemotherapy for Metastatic Breast
10 Carcinoma. **Cancer**, [s. l.], v. 63, p. 37–45, 1988.
- 11 HUANG, S. C. *et al.* Doxorubicin inhibits muscle inflammation after eccentric exercise.
12 **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, [s. l.], v. 8, n. 2, p. 277–284, 2017. Available
13 at: <https://doi.org/10.1002/jcsm.12148>
- 14 HULMI, J. J. *et al.* Prevention of chemotherapy-induced cachexia by ACVR2B ligand
15 blocking has different effects on heart and skeletal muscle. **Journal of Cachexia, Sarcopenia**
16 **and Muscle**, [s. l.], v. 9, n. 2, p. 417–432, 2018. Available at:
17 <https://doi.org/10.1002/jcsm.12265>
- 18 HULTMAN, E. *et al.* Muscle creatine loading in men. **Journal of Applied Physiology**, [s. l.],
19 v. 81, n. 1, p. 232–237, 1996. Available at: <https://doi.org/10.1152/jappl.1996.81.1.232>
- 20 HYDOCK, D. S. *et al.* Characterization of the Effect of In Vivo Doxorubicin Treatment on
21 Skeletal Muscle Function in the Rat. [s. l.], v. 31, p. 2023–2028, 2011.
- 22 JABŁOŃSKA-TRYPUC, A. *et al.* Possible mechanisms of the prevention of doxorubicin
23 toxicity by cichoric acid—antioxidant nutrient. **Nutrients**, [s. l.], v. 10, n. 1, 2018. Available
24 at: <https://doi.org/10.3390/nu10010044>
- 25 JADAPALLI, J. K. *et al.* Cancer Therapy-Induced Cardiovascular Toxicity: Doxorubicin
26 triggers splenic contraction and irreversible dysregulation of cox and lox that alters the

- 1 inflammation-resolution program in the myocardium. **American Journal of Physiology -**
2 **Heart and Circulatory Physiology**, [s. l.], v. 315, n. 5, p. H1091–H1100, 2018. Available at:
3 <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00290.2018>
- 4 JOHNSTON, A. P. W. *et al.* Effect of creatine supplementation during cast-induced
5 immobilization on the preservation of muscle mass, strength, and endurance. **Journal of**
6 **strength and conditioning research / National Strength & Conditioning Association**, [s.
7 l.], v. 23, n. 1, p. 116–120, 2009. Available at: <https://doi.org/10.1519/JSC.0b013e31818efbcc>
- 8 KAVAZIS, A. N.; SMUDER, A. J.; POWERS, S. K. Effects of short-term endurance exercise
9 training on acute doxorubicin-induced FoxO transcription in cardiac and skeletal muscle.
10 **Journal of Applied Physiology**, [s. l.], v. 117, n. 3, p. 223–230, 2014. Available at:
11 <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00210.2014>
- 12 KIM, H. S.; LEE, Y. S.; KIM, D. K. Doxorubicin exerts cytotoxic effects through cell cycle
13 arrest and fas-mediated cell death. **Pharmacology**, [s. l.], v. 84, n. 5, p. 300–309, 2009.
14 Available at: <https://doi.org/10.1159/000245937>
- 15 KLEY, R. A.; VORGERD, M.; TARNOPOLSKY, M. A. Creatine for treating muscle
16 disorders. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, [s. l.], n. 1, 2007. Available at:
17 <https://doi.org/10.1002/14651858.CD004760.pub2>
- 18 KREIDER, R. B. *et al.* International Society of Sports Nutrition position stand: Safety and
19 efficacy of creatine supplementation in exercise, sport, and medicine. **Journal of the**
20 **International Society of Sports Nutrition**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 1–18, 2017. Available at:
21 <https://doi.org/10.1186/s12970-017-0173-z>
- 22 KWON, I. Protective effects of endurance exercise on skeletal muscle remodeling against
23 doxorubicin-induced myotoxicity in mice. **Physical Activity and Nutrition**, [s. l.], v. 24, n. 2,
24 p. 11–21, 2020. Available at: <https://doi.org/10.20463/pan.2020.0010>
- 25 LAWLER, J. M. *et al.* Direct antioxidant properties of creatine. **Biochemical and**
26 **Biophysical Research Communications**, [s. l.], v. 290, n. 1, p. 47–52, 2002. Available at:
27 <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.6164>

- 1 LIRA, F. S. *et al.* Sleep pattern and locomotor activity are impaired by doxorubicin in non-
2 tumor-bearing rats. **Sleep Science**, [s. l.], v. 9, n. 3, p. 232–235, 2016. Available at:
3 <https://doi.org/10.1016/j.slsci.2016.10.006>
- 4 LIU, C. *et al.* Arsenene Nanodots with Selective Killing Effects and their Low-Dose
5 Combination with β -Elemene for Cancer Therapy. **Advanced Materials**, [s. l.], v. 33, n. 37,
6 p. 1–14, 2021. Available at: <https://doi.org/10.1002/adma.202102054>
- 7 LIU, J. *et al.* Irisin enhances doxorubicin-induced cell apoptosis in pancreatic cancer by
8 inhibiting the PI3K/Akt/NF-kB pathway. **Medical Science Monitor**, [s. l.], v. 25, p. 6085–
9 6096, 2019. Available at: <https://doi.org/10.12659/MSM.917625>
- 10 LU, P. Monitoring cardiac function in patients receiving doxorubicin. **Seminars in Nuclear**
11 **Medicine**, [s. l.], v. 35, n. 3 SPEC. ISS., p. 197–201, 2005. Available at:
12 <https://doi.org/10.1053/j.semnuclmed.2005.02.005>
- 13 MADKOUR, L. H. Classifications of DNA binding molecules—Drug interactions. **Nucleic**
14 **Acids as Gene Anticancer Drug Delivery Therapy**, [s. l.], p. 87–101, 2019. Available at:
15 <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-819777-6.00007-x>
- 16 MALTZMAN, J. D.; MILLAR, L. B. Chemotherapy Primer: Why? What? and How? |
17 OncoLink. **OncoLink**, [s. l.], p. 1, 2010. Available at: <https://www.oncolink.org/cancer-treatment/cancer-medications/overview/chemotherapy-primer-why-what-and-how>
- 19 MANN, A.; CHESSELET, M. F. **Techniques for Motor Assessment in Rodents**. Second
20 Edied. [S. l.]: Elsevier Inc., 2015. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405195-9.00008-1>
- 22 MANN, D. L. Inflammatory mediators and the failing heart: Past, present, and the foreseeable
23 future. **Circulation Research**, [s. l.], v. 91, n. 11, p. 988–998, 2002. Available at:
24 <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000043825.01705.1B>
- 25 MARKMAN, T. M.; MARKMAN, M. Cardio-oncology: management of cardiovascular
26 toxicity. **F1000Research**, [s. l.], v. 8, 2019. Available at:

- 1 <https://doi.org/https://doi.org/10.12688/f1000research.14542.1>
- 2 MARZUCA-NASSR, G. N. *et al.* Short-term creatine supplementation changes protein
3 metabolism signaling in hindlimb suspension. **Brazilian Journal of Medical and Biological**
4 **Research**, [s. l.], v. 52, n. 10, p. 1–12, 2019. Available at: [https://doi.org/10.1590/1414-](https://doi.org/10.1590/1414-431x20198391)
5 [431x20198391](https://doi.org/10.1590/1414-431x20198391)
- 6 MCGOWAN, J. V. *et al.* Anthracycline Chemotherapy and Cardiotoxicity. **Cardiovascular**
7 **Drugs and Therapy**, [s. l.], v. 31, n. 1, p. 63–75, 2017. Available at:
8 <https://doi.org/10.1007/s10557-016-6711-0>
- 9 MIN, K. *et al.* Increased mitochondrial emission of reactive oxygen species and calpain
10 activation are required for doxorubicin-induced cardiac and skeletal muscle myopathy.
11 **Journal of Physiology**, [s. l.], v. 593, n. 8, p. 2017–2036, 2015. Available at:
12 <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2014.286518>
- 13 MORISHITA, S. Prevalence of Sarcopenia in Cancer Patients: Review and Future Directions.
14 **International Journal of Physical Medicine & Rehabilitation**, [s. l.], v. 04, n. 03, p. 1–8,
15 2016. Available at: <https://doi.org/10.4172/2329-9096.1000342>
- 16 NESAKUMAR, T. *et al.* Toxicity of Doxorubicin (Dox) to different experimental organ
17 systems. **Life Sciences**, [s. l.], v. 200, p. 26–30, 2018. Available at:
18 <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.03.023>
- 19 NI, J.; ZHANG, L. Cancer Cachexia : Definition , Staging , and Emerging Treatments.
20 **Cancer Management and Research**, [s. l.], v. 12, p. 5597–5605, 2020.
- 21 NISSINEN, T. A. *et al.* Systemic blockade of ACVR2B ligands prevents chemotherapy-
22 induced muscle wasting by restoring muscle protein synthesis without affecting oxidative
23 capacity or atrogenes. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 6, n. September, p. 1–16, 2016. Available
24 at: <https://doi.org/10.1038/srep32695>
- 25 NIU, J. *et al.* Cardiac-targeted expression of soluble fas attenuates doxorubicin-induced
26 cardiotoxicity in mice. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, [s. l.], v.

- 1 328, n. 3, p. 740–748, 2009. Available at: <https://doi.org/10.1124/jpet.108.146423>
- 2 PAL, A.; ROY, A.; RAY, M. Creatine supplementation with methylglyoxal: a potent therapy
3 for cancer in experimental models. **Amino Acids**, [s. l.], v. 48, n. 8, p. 2003–2013, 2016.
4 Available at: <https://doi.org/10.1007/s00726-016-2224-1>
- 5 PAMOUKDJIAN, F. *et al.* Frailty Parameters, Morbidity and Mortality in Older Adults with
6 Cancer: A Structural Equation Modelling Approach Based on the Fried Phenotype. **Journal**
7 **of Clinical Medicine**, [s. l.], v. 9, n. 6, p. 1826, 2020. Available at:
8 <https://doi.org/10.3390/jcm9061826>
- 9 PATRA, S. *et al.* A short review on creatine-creatine kinase system in relation to cancer and
10 some experimental results on creatine as adjuvant in cancer therapy. **Amino Acids**, [s. l.], v.
11 42, n. 6, p. 2319–2330, 2012. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00726-011-0974-3>
- 12 PRADO, C. M. M. *et al.* An exploratory study of body composition as a determinant of
13 epirubicin pharmacokinetics and toxicity. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, [s. l.],
14 v. 67, n. 1, p. 93–101, 2011. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00280-010-1288-y>
- 15 QUINN, C. J.; HYDOCK, D. S. Effects of endurance exercise and doxorubicin on skeletal
16 muscle myogenic regulatory factor expression. **Muscles, Ligaments and Tendons Journal**,
17 [s. l.], v. 7, n. 3, p. 418–425, 2017. Available at: <https://doi.org/10.11138/mltj/2017.7.3.418>
- 18 RAUSCH, V. *et al.* Understanding the common mechanisms of heart and skeletal muscle
19 wasting in cancer cachexia. **Oncogenesis**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 1–13, 2021. Available at:
20 <https://doi.org/10.1038/s41389-020-00288-6>
- 21 RIBEIRO, A. R.; HOWLETT, S. E.; FERNANDES, A. Frailty—A promising concept to
22 evaluate disease vulnerability. **Mechanisms of Ageing and Development**, [s. l.], v. 187, n.
23 February, p. 111217, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.mad.2020.111217>
- 24 RYAN, A. M. *et al.* Effects of weight loss and sarcopenia on response to chemotherapy ,
25 quality of life , and survival. **Nutrition**, [s. l.], v. 68, 2019. Available at:
26 <https://doi.org/10.1016/j.nut.2019.06.020>

- 1 SAKKAS, G. K.; SCHAMBELAN, M.; MULLIGAN, K. **Can the use of creatine**
2 **supplementation attenuate muscle loss in cachexia and wasting?**. [S. l.: s. n.], 2009.
3 Available at: <https://doi.org/10.1097/MCO.0b013e328331de63>
- 4 SANTACRUZ, L. *et al.* Creatine Supplementation Reduces Doxorubicin-Induced
5 Cardiomyocellular Injury. **Cardiovascular Toxicology**, [s. l.], v. 15, n. 2, p. 180–188, 2015.
6 Available at: <https://doi.org/10.1007/s12012-014-9283-x>
- 7 SERGAZY, S. *et al.* Cardioprotective effect of grape polyphenol extract against doxorubicin
8 induced cardiotoxicity. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 1–12, 2020. Available at:
9 <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71827-9>
- 10 SESTILI, P. *et al.* Creatine supplementation affords cytoprotection in oxidatively injured
11 cultured mammalian cells via direct antioxidant activity. **Free Radical Biology and**
12 **Medicine**, [s. l.], v. 40, p. 837–849, 2006. Available at:
13 <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2005.10.035>
- 14 SESTILI, P. *et al.* **New insights into the trophic and cytoprotective effects of creatine in in**
15 **vitro and in vivo models of cell maturation.** [S. l.: s. n.], 2016. Available at:
16 <https://doi.org/10.1007/s00726-015-2161-4>
- 17 SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2018. **CA: A Cancer Journal**
18 **for Clinicians**, [s. l.], v. 68, n. 1, p. 7–30, 2018. Available at:
19 <https://doi.org/10.3322/caac.21442>
- 20 SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer Statistics , 2017. [s. l.], v. 67, n. 1, p. 7–
21 30, 2017. Available at: <https://doi.org/10.3322/caac.21387>.
- 22 SMITH, R. N.; AGHARKAR, A. S.; GONZALES, E. B. A review of creatine
23 supplementation in age-related diseases: more than a supplement for athletes.
24 **F1000Research**, [s. l.], v. 3, n. 0, p. 222–233, 2014. Available at:
25 <https://doi.org/10.12688/f1000research.5218.1>
- 26 SMUDER, A. J. *et al.* Doxorubicin-induced markers of myocardial autophagic signaling in

- 1 sedentary and exercise trained animals. **Journal of Applied Physiology**, [s. l.], v. 115, p.
2 176–185, 2013. Available at: <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00924.2012>
- 3 SMUDER, A. J. *et al.* Exercise protects against doxorubicin-induced markers of autophagy
4 signaling in skeletal muscle. **Journal of Applied Physiology**, [s. l.], v. 111, p. 1190–1198,
5 2011. Available at: <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00429.2011>.
- 6 SONGBO, M. *et al.* Oxidative stress injury in doxorubicin-induced cardiotoxicity.
7 **Toxicology Letters**, [s. l.], v. 307, n. December 2018, p. 41–48, 2019. Available at:
8 <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2019.02.013>
- 9 SPEECHLEY, M.; TINETTI, M. Falls and Injuries in Frail and Vigorous Community Elderly
10 Persons. **Journal of the American Geriatrics Society**, [s. l.], v. 39, n. 1, p. 46–52, 1991.
11 Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1532-5415.1991.tb05905.x>
- 12 TAN, B. H. L. *et al.* Sarcopenia is associated with toxicity in patients undergoing neo-
13 adjuvant chemotherapy for oesophago-gastric cancer. **European Journal of Surgical**
14 **Oncology**, [s. l.], v. 41, n. 3, p. 333–338, 2015. Available at:
15 <https://doi.org/10.1016/j.ejso.2014.11.040>
- 16 TARNOPOLSKY, M. A. *et al.* Creatine monohydrate enhances strength and body
17 composition in Duchenne muscular dystrophy. **Neurology**, [s. l.], v. 62, n. 10, p. 1771–1777,
18 2004. Available at: <https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000125178.18862.9D>
- 19 TARPEY, M. D. *et al.* Doxorubicin causes lesions in the electron transport system of skeletal
20 muscle mitochondria that are associated with a loss of contractile function. **Journal of**
21 **Biological Chemistry**, [s. l.], v. 294, n. 51, p. 19709–19722, 2019. Available at:
22 <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.008426>
- 23 THORN, C. F. *et al.* Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects.
24 **Pharmacogenet Genomics**, [s. l.], v. 21, n. 7, p. 440–446, 2011. Available at:
25 <https://doi.org/10.1097/FPC.0b013e32833ffb56.Doxorubicin>
- 26 TOKARSKA-SCHLATTNER, M. *et al.* New insights into doxorubicin-induced

- 1 cardiotoxicity: The critical role of cellular energetics. **Journal of Molecular and Cellular**
2 **Cardiology**, [s. l.], v. 41, n. 3, p. 389–405, 2006. Available at:
3 <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2006.06.009>
- 4 TOKARSKA-SCHLATTNER, M. *et al.* Reduced creatine-stimulated respiration in
5 doxorubicin challenged mitochondria : Particular sensitivity of the heart. **Journal of molecular**
6 **and cellular cardiology**, [s. l.], v. 1767, p. 1276–1284, 2007. Available at:
7 <https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2007.08.006>
- 8 TOKARSKA-SCHLATTNER, M.; WALLIMANN, T.; SCHLATTNER, U. W. E. Multiple
9 Interference of Anthracyclines with Mitochondrial Creatine Kinases : Preferential Damage of
10 the Cardiac Isoenzyme and Its Implications for Drug Cardiotoxicity. **Molecular**
11 **pharmacology**, [s. l.], v. 61, n. 3, p. 516–523, 2002.
- 12 TOROK, Z. A.; BUSEKRUS, R. B.; HYDOCK, D. S. Effects of Creatine Supplementation on
13 Muscle Fatigue in Rats Receiving Doxorubicin Treatment. **Nutrition and Cancer**, [s. l.], v.
14 72, n. 2, p. 252–259, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1080/01635581.2019.1623900>
- 15 TREJO-AVILA, M. *et al.* Sarcopenia predicts worse postoperative outcomes and decreased
16 survival rates in patients with colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis.
17 **International Journal of Colorectal Disease**, [s. l.], v. 36, n. 6, p. 1077–1096, 2021.
18 Available at: <https://doi.org/10.1007/s00384-021-03839-4>
- 19 VALIYIL, R.; CHRISTOPHER-STINE, L. Drug-related myopathies of which the clinician
20 should be aware. **Current Rheumatology Reports**, [s. l.], v. 12, n. 3, p. 213–220, 2010.
21 Available at: <https://doi.org/10.1007/s11926-010-0104-3>
- 22 VINCENT, D. T. *et al.* The role of antioxidants in the era of cardio-oncology. **Cancer**
23 **Chemotherapy and Pharmacology**, [s. l.], v. 72, n. 6, p. 1157–1168, 2013. Available at:
24 <https://doi.org/10.1007/s00280-013-2260-4>
- 25 WANG, X. S. *et al.* Serum sTNFR1, IL6, and the Development of Fatigue in Patients with
26 Gastrointestinal Cancer Undergoing Chemoradiation Therapy. **Brain Behav Immun.**, [s. l.],
27 v. 26, n. 5, p. 699–705, 2013. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2011.12.007.Serum>

- 1 WEYMANN, K. B.; WOOD, L. J.; MARKS, D. L. A Role for Orexin in Cytotoxic
2 Chemotherapy-Induced Fatigue. **Brain Behav Immun**, [s. l.], v. 37, p. 84–94, 2014.
3 Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2013.11.003.A>
- 4 WHITEHEAD, J. C. *et al.* A clinical frailty index in aging mice: Comparisons with frailty
5 index data in humans. **Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical**
6 **Sciences**, [s. l.], v. 69, n. 6, p. 621–632, 2014. Available at:
7 <https://doi.org/10.1093/gerona/glt136>
- 8 WILLIS, M. S. *et al.* Doxorubicin Exposure Causes Subacute Cardiac Atrophy Dependent on
9 the Striated Muscle-Specific Ubiquitin Ligase MuRF1. **Circulation: Heart Failure**, [s. l.], v.
10 12, n. 3, p. 1–12, 2019. Available at:
11 <https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.118.005234>
- 12 WU, G.; MORRIS, S. M. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. **Biochemical**
13 **Journal**, [s. l.], v. 17, p. 1–17, 1998.
- 14 YORKE, A. *et al.* Development of a Rat Clinical Frailty Index. **Journals of Gerontology -**
15 **Series A Biological Sciences and Medical Sciences**, [s. l.], v. 72, n. 7, p. 897–903, 2017.
16 Available at: <https://doi.org/10.1093/gerona/glw339>
- 17 YU, A. P. *et al.* Acylated and unacylated ghrelin inhibit doxorubicin-induced apoptosis in
18 skeletal muscle. **Acta Physiologica**, [s. l.], v. 211, n. 1, p. 201–213, 2014. Available at:
19 <https://doi.org/10.1111/apha.12263>
- 20 ZHU, H. *et al.* Doxorubicin Redox Biology: Redox Cycling, Topoisomerase Inhibition, and
21 Oxidative Stress. **React Oxyg Species**, [s. l.], v. 1, n. 3, p. 189–198, 2016.
- 22
- 23

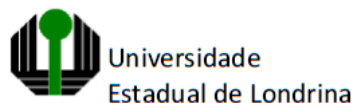
1
2

APÊNDICE

1
2

APÊNDICE A

Comite de ética



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA N° 002/2022

Londrina, 11 de janeiro de 2022.

Prezado(a) professor(a),

Certificamos que o adendo do projeto intitulado: "Toxicidade muscular cardíaca e esquelética induzida pelo quimioterápico doxorubicina em modelo de carcinoma experimental: efeito da suplementação de creatina e do exercício" protocolo CEUA n° 11131.2019.07 sob a responsabilidade de Rafael Deminice que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n° 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n° 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/Uel) no dia 11/01/2022.

Este projeto tem por objetivos estudar o possível efeito protetor da suplementação de creatina e do exercício resistido sobre a toxicidade e atrofia muscular cardíaca e esquelética induzidos por doxorubicina (DOX); estudar o possível papel adjuvante da suplementação de creatina e do exercício resistido no tratamento do câncer com quimioterápico DOX e analisar o efeitos da suplementação de creatina e do exercício físico sobre a sobrevida dos animais inoculados com tumor e tratados com DOX. Grau de invasividade: G13.

A CEUA-Uel autorizou a prorrogação do projeto em 6 meses e a substituição do modelo experimental inicialmente proposto com ratos Wistar para o modelo experimental com 60 camundongos da linhagem C57-BL, bem como a adição do teste de função cardiovascular em esteira ergométrica.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa científica
Vigência da autorização	12/01/2022 a 01/03/2023
Espécie/ linhagem/ raça	Camundongo isogênico – C57 BL
Nº de animais	60
Peso/ Idade	25 g/ 2 meses
Sexo	Machos
Origem	Universidade de São Paulo - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Amostras a serem coletadas	Sangue, músculo sóleo, gastrocnêmio, extensor longo dos dedos, gordura epididimal e retroperitoneal, coração, fígado, baço e tumor.

Cumprir orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/Uel anteriormente à execução das modificações.

Em cumprimento às exigências do CONCEA, em até 30 dias da finalização do projeto de pesquisa ou extensão envolvendo o uso de animais (verificar período de vigência expresso neste ofício), é necessário encaminhar relatório da descrição de uso de animais para ceua@uel.br, conforme modelo disponível no site da CEUA: <http://www.uel.br/comites/ceua/pages/relatorio-de-projetos.php>.

Coloco-me à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessários. Sem mais para o momento, subscrevo-me, cordialmente,

Profª Drª Maria Fernanda Rodrigues Graciano
Vice-coordenadora da CEUA/Uel

Ilmo.(a) Sr.(a)
Prof. (a) Dr. (a). Rafael Deminice
Responsável pelo projeto
C/C para a Chefia do Departamento de Educação Física/ CEFE
C/C para a Direção do Centro de Educação Física e Esportes/ CEFE

Campus Universitário: Rodovia Celso Garcia Cid (PR 445), km 380 - Fone (043) 3371-4000 FAX - Fax 3328-4440 - Caixa Postal 10.011 - CEP 86057-970 - Internet <http://www.uel.br>
LONDRINA - PARANÁ - BRASIL

3