



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

FERNANDA PASCHOAL BLEGNISKI

**PLASTICIDADE MITOCONDRIAL E DE RETÍCULO  
SARCOPLASMÁTICO EM MÚSCULOS COM DIFERENTES  
TIPOS DE FIBRAS E CORRELAÇÃO COM PARÂMETROS  
OXIDATIVOS NA PRÉ-CAQUEXIA INDUZIDA POR TUMOR  
DE WALKER-256**

FERNANDA PASCHOAL BLEGNISKI

**PLASTICIDADE MITOCONDRIAL E DE RETÍCULO  
SARCOPLASMÁTICO EM MÚSCULOS COM DIFERENTES  
TIPOS DE FIBRAS E CORRELAÇÃO COM PARÂMETROS  
OXIDATIVOS NA PRÉ-CAQUEXIA INDUZIDA POR TUMOR  
DE WALKER-256**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Patológicas da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Flávia Alessandra Guarnier

Londrina  
2017

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

B646p Blegniski, Fernanda Paschoal.  
Plasticidade mitocondrial e de retículo sarcoplasmático em músculos com diferentes tipos de fibras e correlação com parâmetros oxidativos na pré-caquexia induzida por tumor de Walker-256 / Fernanda Paschoal Blegniski. - Londrina, 2017.  
86 f. : il.

Orientador: Flávia Alessandra Guarnier.  
Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2017.  
Inclui bibliografia.

1. Patologia experimental - Tese. 2. Patologia experimental - Pós-graduação - Tese. 3. Caquexia - Câncer - Tese. 4. Estresse oxidativo - Tese. I. Guarnier, Flávia Alessandra . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. III. Título.

CDU 616

FERNANDA PASCHOAL BLEGNISKI

**PLASTICIDADE MITOCONDRIAL E DE RETÍCULO  
SARCOPLASMÁTICO EM MÚSCULOS COM DIFERENTES TIPOS DE  
FIBRAS E CORRELAÇÃO COM PARÂMETROS OXIDATIVOS NA  
PRÉ-CAQUEXIA INDUZIDA POR TUMOR DE WALKER-256**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Patológicas da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Patologia Experimental.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Profa. Dra. Flávia Alessandra  
Guarnier  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Profa. Dra. Helenir Medri de Souza  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof. Dr. Luiz Cláudio Fernandes  
Universidade Federal do Paraná – UFPR

Londrina, 15 de março de 2017.

## **AGRADECIMENTOS**

À minha mãe, Antonia, pelo incentivo, compreensão, encorajamento e apoio incondicional.

À minha orientadora Profa. Dra. Flávia Guarnier pela disponibilidade, atenção dispensada, paciência, dedicação e profissionalismo.

Aos pesquisadores Feliciano Protasi e Simona Boncompagni por viabilizarem a realização deste trabalho e conhecimento compartilhado.

Ao laboratório de fisiopatologia e radicais livres. À todos os demais...

*“Não sabendo que era  
impossível, ele foi lá e fez.”*

*— Jean Cocteau.*

BLEGNISKI, Fernanda Paschoal. **Plasticidade mitocondrial e de retículo sarcoplasmático em músculos com diferentes tipos de fibras e correlação com parâmetros oxidativos na pré-caquexia induzida por tumor de Walker-256**. 2017. 86 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

## RESUMO

A caquexia pelo câncer pode ser definida como síndrome multifatorial, na qual há perda contínua de massa muscular, com perda ou ausência de perda de massa gorda, que não pode ser totalmente revertida pela terapia nutricional convencional, conduzindo ao comprometimento funcional progressivo do organismo. Esta síndrome é raramente identificada ou diagnosticada, e ainda com menor frequência, tratada e representa causa direta de mortalidade em até 40% dos pacientes. A perda de massa muscular, característica proeminente da caquexia, surge através de uma combinação de hipoanabolismo, com aumento do catabolismo de proteínas miofibrilares. No entanto, a perda muscular durante a progressão da caquexia pelo câncer ocorre de forma distinta em diferentes tipos de fibras musculares. Assim, o presente trabalho objetivou avaliar a plasticidade mitocondrial e do retículo sarcoplasmático (RS) em músculos esqueléticos com diferentes tipos de fibras, de ratos Wistar portadores da forma sólida do tumor de Walker-256 no estágio de pré-caquexia, assim como investigar o envolvimento do estresse oxidativo nestas alterações, por meio do tratamento com um antioxidante que tem demonstrado atuar positivamente sobre a atrofia. Após 5 dias de implantação tumoral, foram coletados os músculos sóleo e extensor longo dos dedos (EDL). A caracterização de parâmetros fisiológicos foi realizada para classificação do estágio de caquexia. A área de secção transversa foi determinada por morfometria. Os parâmetros de estresse oxidativo foram analisados através das técnicas de quimiluminescência estimulada por terc-butil hidroperóxido (QL), quantificação de proteínas carboniladas e quantificação de glutathiona reduzida (GSH) e oxidada (GSSG). Análises quantitativas mitocondriais e de RS foram determinadas por microscopia eletrônica. A implantação tumoral promoveu diminuição no peso corpóreo dos animais compatível ao estágio de pré-caquexia, seguido de perda significativa de peso do músculo EDL (-15,33%), contrastando com uma pequena perda demonstrada pelo músculo sóleo (-5,14%). As áreas de secção transversa revelaram fibras atroficas no sóleo e EDL, parcialmente prevenidas no grupo tumor tratado com N-acetilcisteína (T5NAC). Os níveis de GSH do sóleo foram significativamente menores no grupo tumor (T5) ( $5,04 \pm 0,78$  mmol / mg de proteína) quando comparados com o grupo controle (C5) ( $7,49 \pm 2,34$ ). Houve aumento significativo na curva de quimiluminescência em T5 somente no músculo EDL, parcialmente prevenida em T5NAC. Os músculos EDL e sóleo não apresentaram alterações na quantificação de grupos carbonílicos. O volume do RS diminuiu no grupo T5, tanto no músculo EDL (18,89%) quanto no sóleo (22,09%) em relação ao grupo C5. Contudo, apenas as fibras do músculo EDL de T5 mostraram volume mitocondrial significativamente reduzido, totalmente revertido em T5NAC. Ainda, o tratamento foi capaz de promover fissão nas mitocôndrias no grupo T5NAC do músculo EDL. Com base nos resultados apresentados, pode-se concluir que durante a fase de pré-caquexia, a perda de massa muscular, acompanhada de alterações oxidativas e ultraestruturais

ocorre primariamente em músculo com metabolismo predominantemente glicolítico, o EDL. Entretanto, adaptação de RS pode ser observadas no músculo sóleo, independentemente da ocorrência de perda de massa muscular ou alteração oxidativa.

**Palavras-chave:** Mitocôndia. Retículo sarcoplasmático. Sóleo. EDL. Caquexia.

BLEGNISKI, Fernanda Paschoal. **Mitochondrial and sarcoplasmic reticulum plasticity in different muscle fiber type and its correlation with oxidative parameters in an experimental model of Walker-256 induced precachexia.** . 2017. 86 p. Dissertation (Master's Degree in Experimental Patology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

## ABSTRACT

Cancer cachexia is defined as a multifactorial syndrome defined by an ongoing loss of skeletal muscle mass, with or without loss of fat mass, which cannot be fully reversed by conventional nutritional support and leads to progressive functional impairment. This syndrome is rarely identified or diagnosed, and still less frequently treated, and represents a direct cause of mortality in up to 40% of patients. Muscle mass loss, preeminent characteristic of cachexia, arises through a combination of hypoanabolism, with increased catabolism of myofibrillar proteins. However, muscle wasting during cancer cachexia progression does not occur similarly in all types of muscle fibers. Therefore, the purpose of this study is to investigate extensor digitorum longus (EDL) and soleus ultrastructural changes related to mitochondria and sarcoplasmic reticulum (SR), and also the correlation with oxidative modifications in a very early stage of cachexia induced by Walker-256 tumor. Five days after tumor implantation soleus and EDL muscle were excised. Characterization of physiological parameters was performed in order to classify cachexia stage. Cross sectional area was determined. Oxidative stress parameters were analyzed by measurement of tert-butyl hydroperoxide-initiated chemiluminescence, quantification of carbonyl protein content, reduced glutathione (GSH) and oxidized glutathione (GSSG). Mitochondrial and SR quantitative analyzes were determined by electron microscopy. Tumor implantation promoted a decrease in body weight in accordance with the precachexia stage, followed by a significant weight loss in EDL muscle (-15.33%), contrasting with a small loss demonstrated by the soleus muscle (5.14%). Cross sectional areas revealed atrophic fibers in soleus and EDL muscles, partially prevented in tumor group treated with N-acetylcysteine (T5NAC). Soleus GSH levels were significantly lower in tumor group (T5) ( $5.04 \pm 0.78$  mmol / mg protein) when compared to control group (C5) ( $7.49 \pm 2.34$ ). There was a significant increase in T5 chemiluminescence curve only in EDL muscle, partially prevented in T5NAC. The EDL and soleus muscles did not present changes in carbonyl protein content quantification. SR volume decreased in T5 group, both in EDL (18.89%) and soleus (22.09%) when compared to C5 group. However, only T5 EDL muscle fibers showed significantly reduced mitochondrial volume, fully reversed in T5NAC. In accordance with this results, it can be concluded that during the pre-cachexia stage, muscle mass loss accompanied by oxidative and ultrastructural changes occurs primarily in muscle with predominant glycolytic metabolism. However, RS adaptation can be observed in the soleus muscle, although there is no muscle waste or oxidative alteration.

**Key words:** Mitochondria. Sarcoplasmic reticulum. Soleus. EDL. Cachexia.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> – Estágios da caquexia .....	14
<b>Figura 2</b> – Ultra-estrutura de fibra muscular estriada esquelética .....	16
<b>Figura 3</b> – Organização do retículo sarcoplasmático muscular esquelético .....	20
<b>Figura 4</b> – Sistema de contração-excitação .....	21
<b>Figura 5</b> – Ativação de vias proteolíticas pelas espécies reativas de oxigênio no músculo esquelético.....	25
<b>Figura 6</b> – Processo de formação dos agregados de lipofuscina .....	27
<b>Figura 7</b> – Relação entre RS e mitocôndrias.....	29

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Representação esquemática da estrutura do músculo esquelético nos diferentes tipos de fibra .....	18
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	Adenosina trifosfato		
Ca <sup>2+</sup>	Cálcio		
CASQ	Calsequestrina		
CASQ1	Calsequestrina isoforma 1		
CASQ2	Calsequestrina isoforma 2		
CPT II	Carnitina-palmitoil transferase II DNA	Ácido desoxirribonucleico	
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica EDL	Extensor longo dos dedos	
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial ERO	Espécies reativas de oxigênio	
FABPpm	<i>Plasma membrane fatty acid binding protein</i> FAT/CD36	<i>Plasma membrane fatty acid translocase</i> FATP	<i>Fatty acid transport protein</i>
GPD2	Desidrogenase glicerol-3-fosfato GSH-Px	Glutationa peroxidase	
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio		
HNE	4-hidroxi-2-nonenal		
IMC	Índice de massa corporal		
IMF	Intermiofibrilar		
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida MDA	Ácido malondialdeído	
MHC	<i>Myosin heavy chain</i> – miosina de cadeia pesada mtDNA	DNA mitocondrial	
NAC	N-acetilcisteína		
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal NOS	Óxido nítrico sintase	
PGC	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor-γ coactivator</i>		
RS	Retículo sarcoplasmático		
RYR	Canais de rianodina		
SERCA	<i>Sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase pump</i>		
SS	Subsarcolemal		
SOD	Superóxido dismutase		

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
1.1	CAQUEXIA PELO CÂNCER .....	12
1.2	MÚSCULO ESTRIADO ESQUELÉTICO.....	15
1.3	ULTRAESTRUTURA DO MÚSCULO ESTRIADO ESQUELÉTICO .....	19
1.3.1	Retículo Sarcoplasmático .....	19
1.3.2	Mitocôndria.....	22
1.4	PROTEÓLISE .....	24
1.5	ALTERAÇÕES OXIDATIVAS RELACIONADAS À MITOCÔNDRIA E AO RETÍCULO SARCOPLASMÁTICO NA CAQUEXIA PELO CÂNCER.....	27
1.6	ANTIOXIDANTES COMO PROPOSTA TERAPÊUTICA NA CAQUEXIA PELO CÂNCER.....	30
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	32
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	33
3.1	OBJETIVO GERAL .....	33
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
	<b>ARTIGO</b> .....	34
	<b>CONCLUSÃO</b> .....	71
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	72
	<b>APÊNDICES</b> .....	84
	APÊNDICE A – Aprovações comite de ética na utilização de animais .....	85

# 1 INTRODUÇÃO

## 3 1.1 CAQUEXIA PELO CÂNCER

5 A caquexia é uma síndrome metabólica complexa  
6 caracterizada pela perda involuntária de peso corpóreo, que por muitos anos foi  
7 reconhecida como um efeito adverso do câncer (FEARON *et al.*, 2011). A  
8 palavra “caquexia” deriva do grego “*kakos*”, má e “*hexis*”, condição  
9 (CONSENSO BRASILEIRO DE CAQUEXIA/ANOREXIA, 2011) e atualmente  
10 não é mais um estado exclusivamente restrito aos pacientes portadores de  
11 neoplasias, já que a desordem acomete pacientes com diferentes doenças  
12 crônicas, como: diabetes, AIDS, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC),  
13 sepse e insuficiência cardíaca congestiva (WALSMITH & ROUBENOFF, 2002).  
14 Anorexia, inflamação e resistência à insulina estão frequentemente presentes  
15 durante a evolução do quadro caquético, além de redução da atividade física,  
16 reduzida tolerância à terapias e, muito notadamente, reduzida sobrevida  
17 (FEARON *et al.*, 2011; ARGILÉS *et al.*, 2014). Desta forma, o caráter  
18 multifatorial e sistêmico da caquexia acaba por dificultar a organização de  
19 critérios que a definam de forma indiscutível. Tanto na experimentação animal  
20 quanto na prática clínica, os sinais variam consideravelmente entre os  
21 indivíduos e a heterogeneidade das manifestações é aceita como própria  
22 característica do quadro.

23 Em termos estatísticos, a caquexia associada ao câncer  
24 representa causa direta de mortalidade em até 40 % dos pacientes. A síndrome  
25 é raramente identificada ou diagnosticada, e ainda, com menor frequência,  
26 tratada. Estudos do início dos anos 2000 mostram que apenas 2,4 % dos  
27 pacientes portadores de tumor recebem o diagnóstico de caquexia. Deste  
28 percentual, apenas 6,4 % recebem tratamento (CONSENSO BRASILEIRO DE  
29 CAQUEXIA/ANOREXIA, 2011).

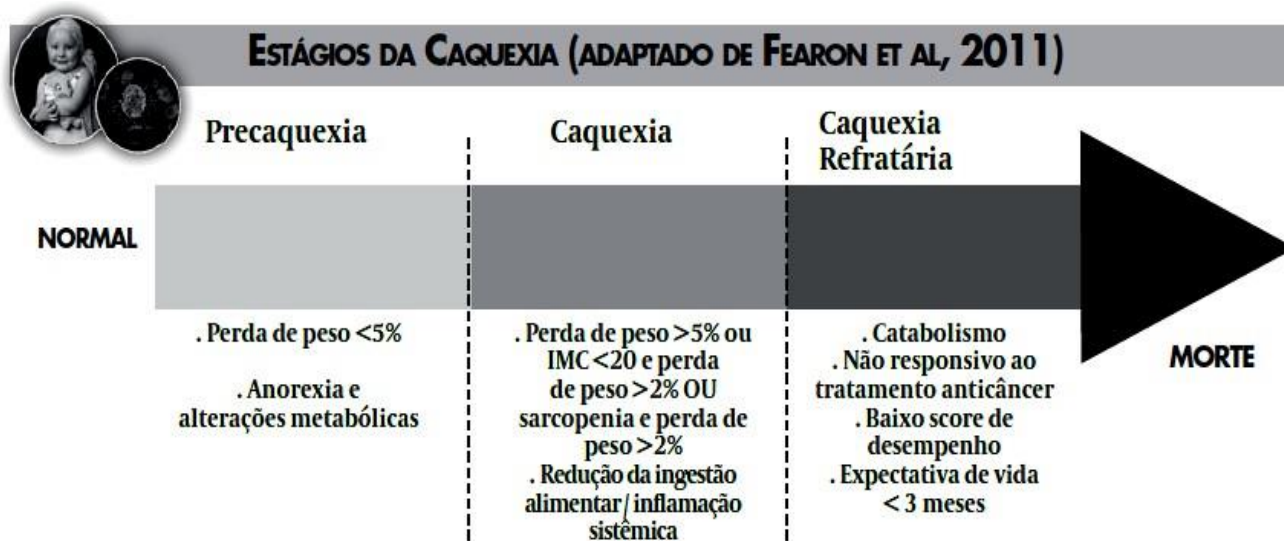
30 Apesar da corrente inconsistência sobre a definição do termo  
31 caquexia para fins de diagnóstico, o critério mais utilizado na detecção da  
32 síndrome é ainda a perda de peso. No entanto, há mais de 15 anos a caquexia  
33 é distinguida da má nutrição. No que diz respeito à história da definição, em  
34 2009, Bozzetti *et al.* definiram a caquexia como “processo na qual há perda de

1 peso e massa celular, em concomitância à redução da ingestão”. Finalmente,  
2 Fearon *et al.* (2011), estabeleceram, por meio da publicação de um Consenso,  
3 que a caquexia pelo câncer pode ser definida como “síndrome multifatorial, na  
4 qual há perda contínua de massa muscular, com perda ou ausência de perda  
5 de massa gorda, que não pode ser totalmente revertida pela terapia nutricional  
6 convencional, conduzindo ao comprometimento funcional progressivo do  
7 organismo”.

8 Os critérios diagnósticos estabelecidos pelo grupo internacional  
9 proponente da definição incluem: perda involuntária de peso superior a 5%, ou  
10 2% (em indivíduos já abaixo dos valores esperados de peso, segundo o índice  
11 de massa corporal – IMC < 20kg/m<sup>2</sup>) ou presença de sarcopenia. Ainda, no  
12 mesmo documento, foi proposta uma classificação de acordo com a gravidade  
13 em: pré-caquexia, caquexia e caquexia refratária. O primeiro estágio seria  
14 definido pela perda de peso inferior a 5%, e presença de anorexia associada a  
15 algum tipo de alteração metabólica; o segundo estágio, como perda de peso  
16 igual ou superior a 5%, ou de 2% com IMC <20 kg/m<sup>2</sup>, ou sarcopenia  
17 acompanhada de perda de peso corporal equivalente ou superior a 2%. Ainda,  
18 deve-se levar em conta a presença frequente de redução da ingestão alimentar  
19 e de inflamação sistêmica. O terceiro estágio inclui os pacientes com diferentes  
20 graus de caquexia, mas nos quais há intenso catabolismo e que não  
21 respondem ao tratamento anti-câncer. Um quadro representativo dos estágios  
22 da caquexia, segundo a definição de Fearon *et al.* (2011) encontra-se  
23 apresentado na Figura 1.

24 Talvez o fato mais importante a ser considerado seja que a  
25 síndrome da caquexia no câncer está diretamente associada ao aumento da  
26 mortalidade e diminuição da expectativa de vida (RUBIN, 2003), apesar de não  
27 haver homogeneidade de incidência entre os tipos de câncer. A ocorrência é  
28 mais comum em pacientes com câncer de pulmão, pancreático, prostático e do  
29 trato gastrointestinal superior, enquanto que em pacientes com câncer de  
30 mama e hematológico sua manifestação clínica é rara (MARTIGNONI *et al.*,  
31 2003; GORDON *et al.*, 2005). No entanto, estes dados são influenciados pela  
32 ausência de diagnóstico precoce e, nesta fase, a caquexia já é comumente  
33 refratária. Durante a evolução do quadro caquético, o paciente está propenso a  
34 apresentar sintomas como fadiga, fraqueza, perda de força muscular, baixa da

- 1 atividade física e da resposta ao tratamento quimioterápico, diminuindo assim a  
 2 qualidade e expectativa de vida (DONOHOE et al, 2011).



**LEGENDA: IMC - ÍNDICE DE MASSA CORPORAL**

- 3 **Figura 1. Estágios da caquexia.** Síndrome da caquexia associada ao câncer classificada  
 4 segundo a gravidade, em pré caquexia, caquexia e caquexia refratária. Retirado de consenso  
 5 brasileiro de caquexia/anorexia, 2011.

6

7

8 A fadiga parecer ser a comorbidade de maior prevalência,  
 9 acometendo 74 % dos pacientes, e estando intimamente relacionada à perda  
 10 de massa magra. A caquexia pelo câncer é evidenciada pela perda progressiva  
 11 de massa muscular, com ou sem depleção de tecido adiposo. A perda de 30 %  
 12 de peso corpóreo é equivalente ao catabolismo de 75 % de proteínas  
 13 musculares, enquanto proteínas não musculares são relativamente  
 14 preservadas. Aparentemente, a atrofia muscular se deve à diminuição na  
 15 síntese de novas proteínas com aumento da ativação de vias de degradação  
 16 proteica, promovida pela presença tumoral (TISDALE, 2010). Neste fato parece  
 17 residir a principal explicação para a perda de massa, principalmente muscular,  
 18 começar a ocorrer antes da diminuição da ingesta alimentar, nos pacientes  
 19 portadores de neoplasias (TISDALE, 2001). Atualmente, não existem  
 20 alternativas terapêuticas eficientes na reversão da perda de massa muscular e,  
 conseqüentemente, da fadiga apresentada por estes indivíduos.

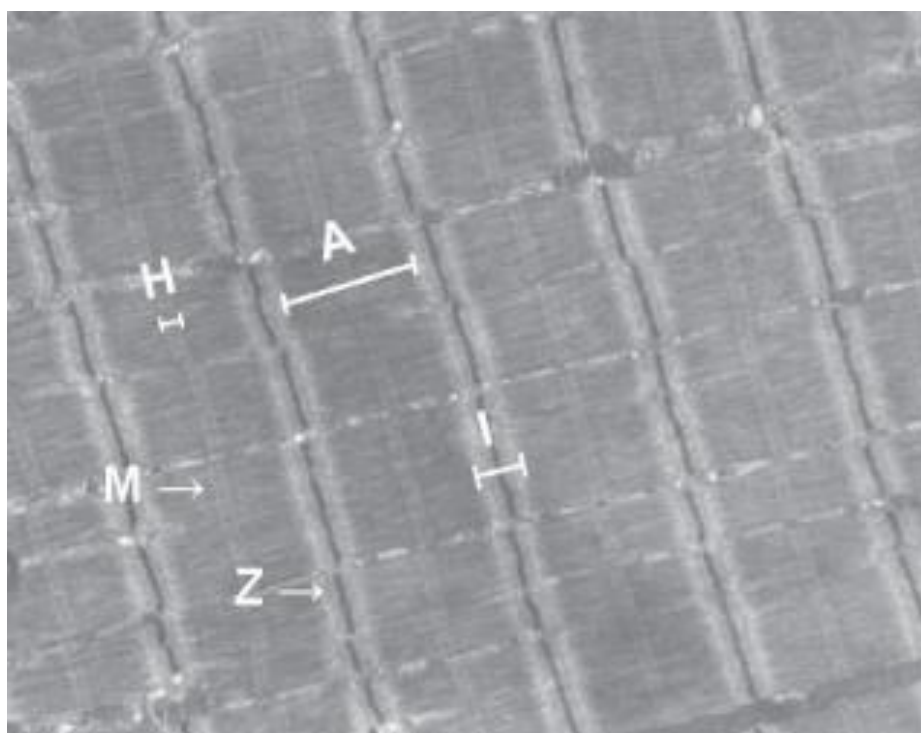
## 1 1.2 MÚSCULO ESTRIADO ESQUELÉTICO

2  
3 O músculo estriado esquelético representa cerca de 40% da  
4 massa corpórea total e é o maior sítio de atividade metabólica em mamíferos,  
5 além da maior fonte de reserva energética. A heterogeneidade das fibras  
6 musculares que o compõem é a responsável por permitir que um mesmo  
7 músculo seja recrutado para diferentes tarefas: atividade contínua de baixa  
8 intensidade (postura), contrações submáximas repetidas (locomoção) e  
9 contrações máximas rápidas e fortes (pulo e chute). O repertório de funções  
10 metabólicas e motoras é mediado por fibras musculares especializadas  
11 (SCHIAFFINO & REGGIANI, 2011).

12 O tecido muscular esquelético é composto, basicamente, pelo  
13 arranjo de células multinucleadas alongadas, por isso também chamadas de  
14 fibras musculares, associadas ao tecido conectivo. O tamanho de um músculo  
15 é determinado, principalmente, pelo número e tamanho de fibras musculares  
16 individuais, ainda que processos patológicos possam alterar esta relação.  
17 Ademais, células satélites, localizadas entre o sarcolema e a lâmina basal,  
18 fazem parte do arranjo muscular com a finalidade de contribuir para o  
19 crescimento e regeneração muscular, através da ativação de fatores  
20 miogênicos (FRONTERA & OCHALA, 2015).

21 Músculos individuais são circundados por uma camada de  
22 tecido conectivo, o epimísio; grupos de fibras são dispostas em feixes e  
23 envoltas pelo perimísio; uma única fibra muscular é envolvida pelo sarcolema.  
24 Associado ao sarcolema existe um complexo de diversas proteínas fisicamente  
25 conectadas a estrutura interna contrátil, particularmente a actina. A ausência  
26 (parcial ou completa), ou mesmo a disfunção de qualquer estrutura  
27 componente do tecido muscular pode resultar em dano ao sarcolema, fraqueza  
28 muscular e atrofia (FRONTERA & OCHALA, 2015). Os filamentos contráteis de  
29 actina e miosina (também denominados filamentos finos e grossos,  
30 respectivamente), são envoltos por invaginações da membrana plasmática,  
31 retículo sarcoplasmático e pelas mitocôndrias. Filamentos de actina e miosina  
32 se dispõem-se de tal maneira que bandas claras e escuras alternam-se ao  
33 longo da fibra muscular: As bandas claras contêm somente filamentos de  
34 actina e são denominadas de banda I; As bandas escuras possuem filamentos

1 de actina e miosina e são denominadas de banda A. No centro da banda I, há  
2 uma linha escura, a linha Z (de *Zwischenscheibe*, linha intermediária em  
3 alemão), esta delimita a unidade repetitiva das miofibrilas, o sarcômero, que  
4 apresenta a metade de duas bandas I e uma banda A central e mede 2,5  $\mu\text{m}$   
5 de comprimento no músculo em repouso. Ao microscópio eletrônico,  
6 reconhece-se, no centro da banda A, uma região mais clara, a banda H (do  
7 alemão *hell*, claro), onde somente filamentos de miosina são encontrados. No  
8 centro dessa banda, há uma faixa escura, a linha M (do alemão *Mitte*, meio). A  
9 organização das bandas de fibras musculares encontra-se na figura 2  
10 (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2011; GARTNER & HIATT, 2007).



11 **Figura 2. Ultra-estrutura de fibra muscular estriada esquelética.** Imagem observada em  
12 microscopia eletrônica de transmissão. Miofibrilas organizadas em banda A, I, H e linhas Z e M.  
13 Retirado de SILVA & CARVALHO, 2007.

14

15 Originalmente, a classificação dos tipos de fibras se baseava  
16 na cor do músculo; vermelho (muita mioglobina) e branco (pouca mioglobina); e  
17 se correlacionava com a força de contração (lenta e rápida, respectivamente).  
18 Posteriormente, com base na expressão de cadeias pesadas de miosina, os  
19 tipos de fibra foram divididos em: fibras do tipo 1 (contração lenta) e fibras do  
20 tipo 2A, 2X e 2B (contração rápida, apresentando características oxidativas  
21 diferentes de 2A a 2B) (SCHIAFFINO & REGGIANI 2011). A representação

1 esquemática da estrutura do músculo esquelético e dos diferentes tipos de fibra  
2 de acordo com a expressão das cadeias pesadas de miosina encontram-se  
3 apresentados na tabela 1.

4                   Ainda, fibras 2A são rápidas intermediárias, possuindo  
5 potencial moderadamente desenvolvido para geração de força, utilizando tanto  
6 o metabolismo oxidativo como o glicolítico para a produção de energia durante  
7 a contração muscular, sendo rápida, porém com certa resistência à fadiga.  
8 Fibras 2B utilizam, predominantemente, o metabolismo glicolítico para a  
9 produção de energia, sendo mais rápida, porém mais fadigável que a 2A. A  
10 composição do músculo em relação aos diferentes tipos de fibras depende da  
11 função do músculo. Músculos posturais como, por exemplo, o músculo sóleo,  
12 possuem maior proporção de fibras de contração lenta (tipo 1), oxidativas e  
13 resistentes à fadiga, enquanto os músculos envolvidos em atividades rápidas e  
14 que exigem força, como por exemplo bíceps braquial, possuem maior  
15 quantidade de fibras de contração rápida (tipo 2) altamente fadigáveis (LIBERA  
16 et al., 1997; GOLDSPINK, 2005).

17                   Na literatura, os músculos extensor longo dos dedos (EDL, do  
18 inglês *extensor digitorum longus*) e sóleo são representantes típicos de  
19 músculos de contração rápida e contração lenta, respectivamente (JÜRGENS,  
20 2002). O sóleo, um músculo antigravidade localizado na porção posterior da  
21 panturrilha, é responsável por sustentar atividade prolongada. Este é composto  
22 majoritariamente de fibras do tipo 1, e um número variável, no entanto,  
23 geralmente baixo de fibras 2A, oscilando de acordo com a espécie animal  
24 avaliada. Por sua vez, o músculo EDL, localizado na região antero-lateral da  
25 perna, é composto por três subtipos diferentes de fibras: poucas fibras do tipo 1  
26 e porções variáveis de fibras tipo 2A e 2B, de acordo com a espécie animal  
27 analisada (NOVÁK et al., 2010). No entanto, fibras de tipo 2B representam  
28 maioria.

29                   Os diferentes tipos de fibras se mostram diversamente  
30 susceptíveis ao processo atrófico, com fibras oxidativas mais resistentes e  
31 fibras glicolíticas mais propensas a perda de proteínas e organelas  
32 (ROMANELLO & SANDRI, 2010), sugerindo que a expressão de genes  
33 importantes na fosforilação oxidativa e glicolítica são coordenadamente  
34 suprimidas (LECKER et al., 2004). Como demonstrado por Sandri *et al.*, (2006),

1 a PGC-1 $\alpha$ , gene regulador para a biogênese mitocondrial, se mostra  
 2 negativamente regulada em diferentes modelos de perda de massa muscular.  
 3 Além disso, quando os níveis de PGC-1 $\alpha$  são mantidos, seja pelo uso de  
 4 animais transgênicos ou transfecção de fibras musculares adultas, o tecido  
 5 muscular é protegido de atrofia induzida experimentalmente. Estes resultados,  
 6 contribuem para o entendimento da resistência de fibras oxidativas frente ao  
 7 processo de perda de massa muscular (LI et al., 2007), apesar de não explicá-  
 8 lo por completo.

9 A massa do músculo estriado esquelético e o tamanho das  
 10 fibras que o compõem podem variar de acordo com condições fisiológicas e  
 11 patológicas. Um processo hipertrófico pode ser instalado em decorrência da  
 12 exposição a estímulo hormonal anabólico, como testosterona e agonistas  $\beta$ -  
 13 adrenérgicos ou em resposta a sobrecarga mecânica. Já um processo de  
 14 atrofia muscular pode ocorrer em resposta ao uso de corticosteroides, ou  
 15 resultar do processo de envelhecimento, diabetes, carência de nutrientes,  
 16 imobilização e câncer, ou mesmo devido a produção crônica de espécies  
 17 reativas de oxigênio (ERO) (SCHIAFFINO, 2013).

18  
 19 **Tabela 1.** Representação esquemática da estrutura do músculo esquelético  
 20 nos diferentes tipos de fibra.

<b>Método de classificação das fibras</b>	<b>Terminologia da classificação das fibras</b>		
Histoquímico	Tipo 1	Tipo 2A	Tipo 2B
Coloração	Vermelha	Branca	Branca
Bioquímico	Lenta Oxidativa	Rápida Oxidativa	Rápida Glicolítica
Metabolismo	Oxidativo	Oxidativo-Glicolítico	Glicolítico
Limiar de fadiga	Alta resistência à fadiga	Moderada resistência à fadiga	Baixa resistência à fadiga
Imunohistoquímico	MHC I	MHC IIa	MHC IIb e MHC IIx

21 MHC: *myosin heavy chain* (cadeia pesada de miosina). Fonte: Elaborada pelo autor.

### 1 1.3 ULTRAESTRUTURA DO MÚSCULO ESTRIADO ESQUELÉTICO

2  
3 A contração muscular, em mamíferos, é dependente de íons  
4 cálcio (liberados do retículo sarcoplasmático) e adenosina trifosfato (ATP –  
5 produzido pela mitocôndria) (PIETRANGELO et al., 2015). Desta forma, a  
6 íntima associação entre retículo sarcoplasmático (RS) e mitocôndrias no  
7 processo de adaptação à novas demandas energéticas se faz necessária.

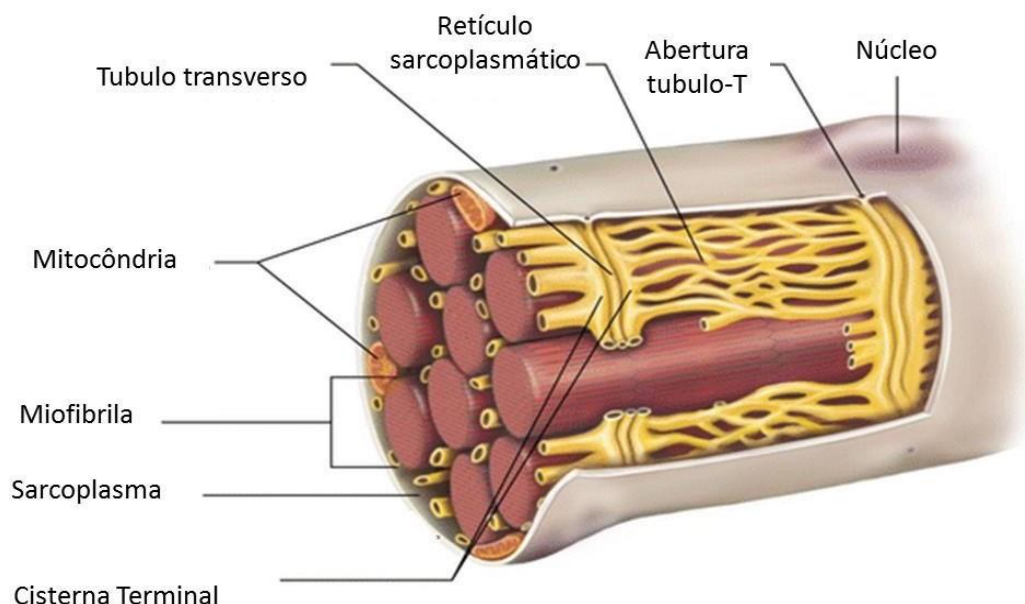
#### 9 1.3.1 RETÍCULO SARCOPLASMÁTICO

10  
11 Os íons cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) são versáteis segundos mensageiros  
12 (BONCOMPAGNI et al., 2009). Elevações transientes na concentração  
13 intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) desempenham papel em diferentes funções  
14 fisiológicas; expressão de genes, diferenciação celular, liberação de  
15 neurotransmissores, motilidade e contração celular (Rasmussen et al., 1976;  
16 Endo, 2006). No músculo esquelético, mudanças na  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , responsáveis pela  
17 contração muscular, são decorrentes da rápida liberação deste íon,  
18 subsequente à despolarização do sarcolema (PAOLINI et al, 2007).

19 O retículo sarcoplasmático (RS) é um sistema altamente  
20 específico, composto por uma rede de membranas em estreito contato com as  
21 fibras musculares, e constitui o depósito intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  (INESI & DE MEIS,  
22 1989). A despolarização do sarcolema culmina em sinalização para a rápida  
23 liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  pelo RS, através dos canais de rianodina (RyR), resultando  
24 em aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático, o qual se liga à troponina C, permitindo a  
25 formação de pontes-cruzadas entre os filamentos de actina e miosina, com  
26 consequente encurtamento do sarcômero, dando início ao processo de  
27 contração muscular (DIRKSEN, 2009). Ainda, ao RS são atribuídos dois  
28 processos essenciais ao acoplamento de excitação-contração: recaptção de  
29  $\text{Ca}^{2+}$  ao início do relaxamento muscular e armazenamento de  $\text{Ca}^{2+}$  durante o  
30 estado muscular quiescente (AUBIER, 1998). A organização do RS na  
31 estrutura do músculo e a sua distribuição encontram-se apresentados na figura  
32 3.

33 O aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  mioplásmico durante o período contrátil é  
34 transitório, com rápido retorno aos níveis basais, através da recaptura via

1 bomba  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase do RS (SERCA, do inglês *sarcoplasmic-endoplasmic*  
 2 *reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase*) (MURPHY et al, 2009). No músculo estriado  
 3 esquelético, as SERCA estão localizadas ao longo da membrana do RS. A  
 4 SERCA 1 é encontrada em fibras de contração rápida, enquanto SERCA 2 é a  
 5 principal isoforma em fibras de contração lenta (ROSSI & DIRKSEN, 2006).

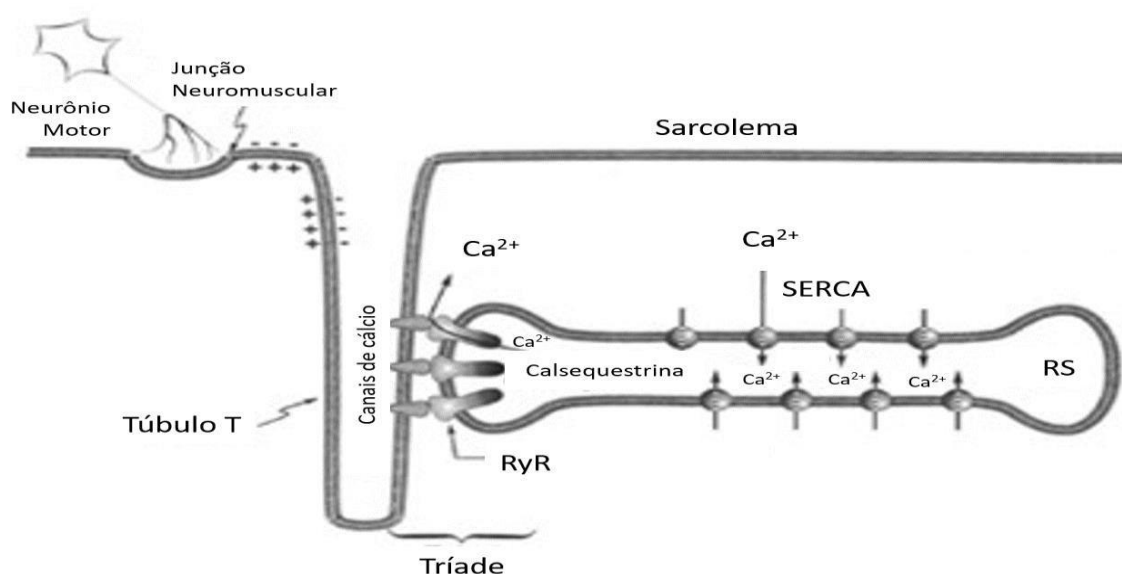


**Figura 3. Organização do retículo sarcoplasmático muscular esquelético.** Adaptado de Frontera & Ochala, 2015.

6  
 7 A calsequestrina (CASQ), localizada no lúmen do RS e em  
 8 estreita proximidade aos locais de liberação de  $\text{Ca}^{2+}$ , é uma proteína com alta  
 9 capacidade de se ligar a este íon (JORGENSEN *et al.* 1983; FRANZINI-  
 10 ARMSTRONG *et al.* 1987). Em mamíferos, duas isoformas são descritas e  
 11 caracterizadas: isoforma muscular esquelética e muscular cardíaca, CASQ 1 e  
 12 CASQ 2, respectivamente. Em fibras de contração lenta de mamíferos, a  
 13 isoforma CASQ 2 é a mais abundante e é co-expressa juntamente à CASQ 1  
 14 em uma taxa 1:3 em adultos (DAMIANI *et al.*, 1990), entretanto em fibras de  
 15 contração rápida, CASQ 1 é a única isoforma encontrada (SACCHETTO *et*  
 16 *al.*, 1993). A representação esquemática do sistema de contração-excitação e  
 17 as suas respectivas proteínas encontra-se apresentada na figura 4.

18 A concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  intraluminal livre reflete na limitação de  
 19 seu transporte ativo (INESI & DE MEIS, 1989). A recaptura de  $\text{Ca}^{2+}$  pela  
 20 SERCA ocorre contra um gradiente de concentração altamente elevado, dessa

1 forma, a CASQ torna-se fundamentalmente importante na manutenção da  
 2 baixa  $[Ca^{2+}]_i$  no lúmen sarcoplasmático. Particularmente, a promoção de menor  
 3 gradiente é importante para fibras de contração rápida, uma vez que a  
 4 quantidade de  $Ca^{2+}$  liberada e recapturada é muito maior quando comparadas  
 5 às fibras de contração lenta (FRYER & STEPHENSON, 1996).



6  
 7 **Figura 4. Sistema de contração-excitação.** Adaptado de:  
 8 <http://slideplayer.com.br/slide/295297/>.

9  
 10 O RS de fibras de contração rápida e contração lenta  
 11 apresentam diferenças estruturais, quando comparados (OGATA & MURATA  
 12 1969; GAUTHIER 1969; SCHIAFFINO et al., 1970; TOMANEK et al., 1973). O  
 13 RS é ricamente desenvolvido no EDL, diferentemente do músculo sóleo, com  
 14 exceção da região próxima a linha-Z (SCHIAFFINO et al., 1970). Entretanto, as  
 15 taxas de liberação de  $Ca^{2+}$  do RS dos músculos EDL e sóleo parecem não  
 16 variar (SMITH et al., 2013). Como descrito por Murphy et al. (2009), este fato  
 17 parece estar associado a alta concentração de CASQ em fibras musculares do  
 18 EDL, capazes de prevenir a saída excessiva de  $Ca^{2+}$ .

19 Estudos recentes demonstraram que durante a atrofia  
 20 desencadeada por ventilação mecânica e também no desuso, o RS aumenta  
 21 sua capacidade de liberação de  $Ca^{2+}$ , e isso se deve a oxidação/nitrosilação  
 22 dos canais de rianodina (MATECKI et al., 2016; LAMBOLEY et al., 2016).

1 Nenhum estudo avalia com profundidade as alterações nesta organela durante  
2 o desenvolvimento da caquexia pelo câncer.

### 3 4 1.3.2 MITOCÔNDRIA

5  
6 As mitocôndrias são organelas de sinalização e bioenergética  
7 essenciais na detecção de estresse celular, permitindo adaptação ao meio.  
8 Uma das principais funções desta organela é a produção de ATP. Contudo,  
9 desempenham muitas outras atividades além da produção de energia,  
10 incluindo regulação de sinalização celular e de morte celular (VYAS et al.,  
11 2016).

12 O músculo estriado esquelético apresenta duas populações de  
13 mitocôndria fenotipicamente distintas: As mitocôndrias intermiofibrilares (IMF),  
14 inseridas entre as miofibrilas, e as mitocôndrias subsarcolemais (SS),  
15 localizadas logo abaixo da membrana plasmática. Estas duas populações  
16 apresentam propriedades funcionais e bioquímicas características.  
17 Mitocôndrias SS fornecem energia para eventos relacionados ao sarcolema,  
18 tais como sinalização e transporte de íons e substrato, enquanto mitocôndrias  
19 IMF fornecem ATP para a realização da contração muscular (VITORINO,  
20 2015).

21 Uma das diferenças clássicas e distintas de diferenciação do  
22 tipo de fibra, se baseia na diferença de densidade do volume mitocondrial.  
23 Fibras oxidativas são ricas em mitocôndrias, as quais são mais abundantes em  
24 músculos de contração lenta. Fibras glicolíticas, presente em músculos de  
25 contração rápida, apresentam volume mitocondrial diminuído. Dessa forma,  
26 segundo a classificação metabólica, as fibras podem ser classificadas em:  
27 oxidativa-lenta, ricas em mitocôndria (tipo 1); rápida-oxidativa, ricas em  
28 mitocôndria (tipo 2A e 2X); rápida-glicolítica, com poucas mitocôndrias (tipo 2B)  
29 (SCHIAFFINO & REGGIANI, 2011).

30 Ainda, é possível correlacionar diferenças quantitativas de  
31 proteínas mitocondriais e atividade enzimática entre os tipos de fibras.  
32 Proteínas envolvidas no metabolismo de ácidos graxos, como a *carnitina-*  
33 *palmitoil transferase II* (CPT II), que está 6 vezes mais presente em fibras do  
34 tipo 1 quando comparada às fibras do tipo 2X e 2B. Esta característica é

1 claramente consistente com o fenótipo metabólico de músculos de contração  
2 lenta, que derivam uma porção significativa da sua energia a partir da oxidação  
3 de ácidos graxos e expressam níveis mais elevados de proteínas envolvidas no  
4 transporte deste, no sarcolema (FAT/CD36, FATP e FABPpm), quando  
5 comparado com músculos de contração rápida (PICARD et al., 2012). Em  
6 contraste, a desidrogenase glicerol-3-fosfato (Gpd2), uma enzima intermediária  
7 da via glicolítica, é 10 vezes mais abundante em fibras do tipo 2B quando  
8 comparada às fibras do tipo 1 e 2A (MURGIA et al., 2015).

9           Em termos estruturais, as mitocôndrias IMF distribuem-se em  
10 um complexo sistema de redes ao longo das miofibrilas. Seu número e área de  
11 superfície muda de acordo com a necessidade de eficiência energética. Em  
12 termos práticos, dá-se o nome de relação fusão/fissão mitocondrial à  
13 capacidade das mitocôndrias de compartilharem membranas conforme a  
14 demanda energética aumenta (PICARD et al., 2013).

15           Morfologia e número de mitocôndrias são dependentes do  
16 balanço de dois processos antagonistas: Fusão e fissão. A fusão de  
17 mitocôndrias isoladas promove a formação de uma extensa rede  
18 interconectada. Este processo possibilita a conjunção de conteúdos  
19 intracelulares por estas organelas, proporcionando redistribuição de  
20 metabolitos, proteínas e DNA mitocondrial (mtDNA), com consequente  
21 aumento da eficiência na produção de ATP. Em contrapartida, o processo de  
22 fissão ou fragmentação é um mecanismo capaz de segregar componentes da  
23 rede mitocondrial que apresentem dano, permitindo sua remoção por via  
24 lisossomal. Este processo previne acúmulo local de mitocôndrias alteradas (LIU  
25 et al., 2009; ROMANELLO et al., 2010).

26           Múltiplos estudos têm demonstrado um desbalanço nas  
27 atividades de fusão e fissão na progressão do câncer, com consequente  
28 elevação no processo de fissão e decréscimo nas taxas de fusão, resultando  
29 em fragmentação da rede mitocondrial muscular. Com o exposto, pode-se  
30 concluir que a progressão tumoral é capaz de induzir alterações em número e  
31 funcionalidade mitocondrial no músculo esquelético (PADFIELD et al, 2005;  
32 HANAI et al, 2007). Como demonstrado por Romanello et al. (2010), a ativação  
33 de fissão mitocondrial é capaz de induzir a atrofia muscular. Ainda,  
34 mitocôndrias danificadas podem gerar ERO localmente, promovendo assim a

1 ativação de fatores indutores do catabolismo proteico muscular, como FoxO e  
2 NFκB.

3

#### 4 1.4 PROTEÓLISE

5

6 A adaptação celular está relacionada com a produção de ERO,  
7 sendo que a produção aguda induz respostas diferentes da produção crônica.  
8 A última, em intensidades de baixa a moderada, pode modular vias de  
9 sinalização que resultam em ativação de mecanismos proteolíticos (POWERS  
10 et al., 2005; POWERS, 2007). As principais proteases envolvidas na  
11 degradação de proteínas musculares são as proteases ativadas pelo  $Ca^{2+}$   
12 (calpaínas), as caspases, o sistema proteassomal e os lisossomos.

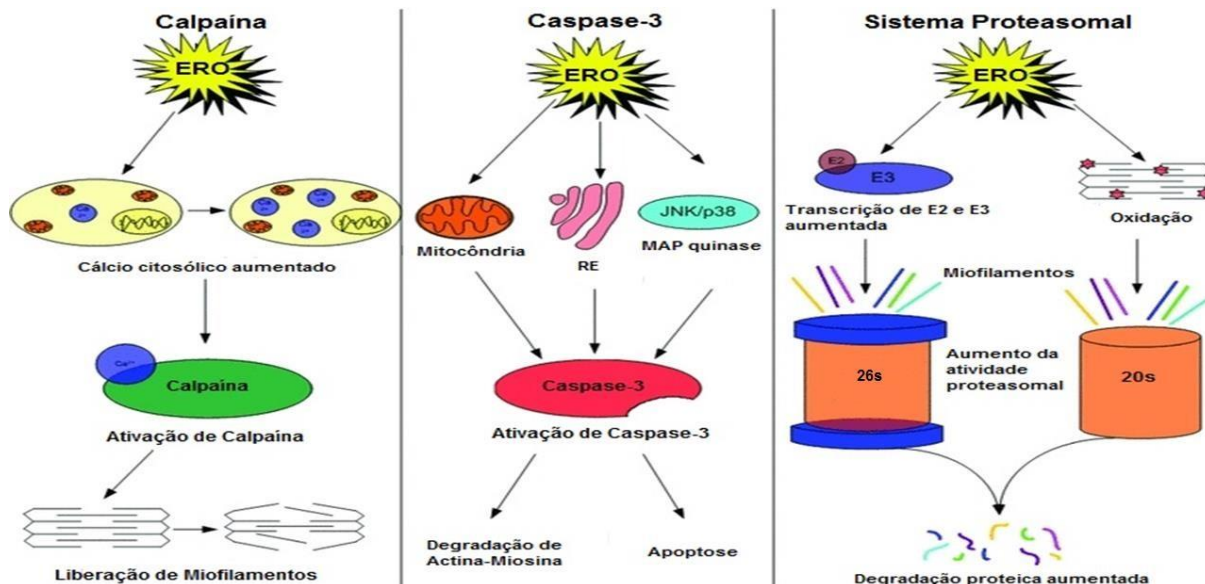
13 As calpaínas são proteases citosólicas normalmente  
14 encontradas em estado quiescente ou inativadas (COSTELLI et al., 2005). Sua  
15 ativação exige elevação na concentração de  $Ca^{2+}$  intracelular, que ativadas  
16 promovem proteólise irreversível de proteínas do citoesqueleto e associadas à  
17 membrana, além de miofilamentos de ancoramento do sarcômero. Elevação da  
18 concentração de ERO no músculo promove aumento citosólico dos níveis de  
19  $Ca^{2+}$  livre por diferentes mecanismos: inibição da atividade do transportador  
20  $Ca^{2+}$  ATPase do RS, com prejuízo na recaptura do  $Ca^{2+}$  livre; inibição da  
21 atividade do transportador  $Ca^{2+}$  ATPase da membrana plasmática, impedindo a  
22 remoção do  $Ca^{2+}$  intracelular; liberação do  $Ca^{2+}$  armazenado no RS (POWERS  
23 et al., 2009).

24 As caspases são endoproteases relacionadas com a degradação  
25 proteica e apoptose. A ativação da caspase-3 é capaz de promover  
26 degradação do complexo intacto de actina-miosina, responsáveis pela  
27 contração da estrutura sarcomérica (DU et al., 2004; MCCLUNG et al., 2007).  
28 O controle de sua ativação envolve diferentes vias interconectadas, no entanto  
29 já foi demonstrado que o aumento de ERO contribui para sua ativação pelas  
30 vias de sinalização mitocondrial e do RS no tecido muscular (PRIMEAU et al.,  
31 2002).

32 No músculo, bem como em os outros tecidos, o sistema  
33 ubiquitina- proteassoma é responsável pela maioria dos processos proteolíticos  
34 intracelulares. A estrutura do complexo proteassomal é composta pela

1 subunidade 20S, envolvida na hidrólise proteica e pela subunidade regulatória  
 2 19S. O reconhecimento da proteína pela subunidade 19S é dependente das  
 3 enzimas: E1, responsável pela ativação da ubiquitina; E2, responsável por  
 4 carregamento da ubiquitina ativada; E3, responsável por catalisar a ligação da  
 5 ubiquitina à cadeia amino-terminal da proteína. O aumento na produção de  
 6 ERO regula a transcrição das enzimas E2 e E3, aumentando a velocidade do  
 7 processo proteolítico (CAO, 2005). O desdobramento e desnaturação parcial  
 8 de proteínas oxidadas resulta na exposição de sítios hidrofóbicos dos  
 9 aminoácidos, promovendo seu reconhecimento pelo core 20S sem a  
 10 necessidade de ubiquitinação (HOHN, 2013).

11 Os diferentes sistemas proteolíticos descritos podem ser  
 12 ativados de formas diversas pela presença de ERO ou ERN, induzindo atrofia.  
 13 Atualmente, é muito bem aceito que o estresse oxidativo, em decorrência da  
 14 presença tumoral, promove alterações na regulação de vias de sinalização que  
 15 contribuam para o remodelamento muscular (GUARNIER et al., 2010;  
 16 POWERS et al., 2009). Esses diferentes mecanismos encontram-se resumidos  
 17 na Figura 5.



18 **Figura 5: Ativação de vias proteolíticas pelas espécies reativas de oxigênio no músculo**  
 19 **esquelético.** Fonte: Adaptado de POWERS et al., 2009.

20

21

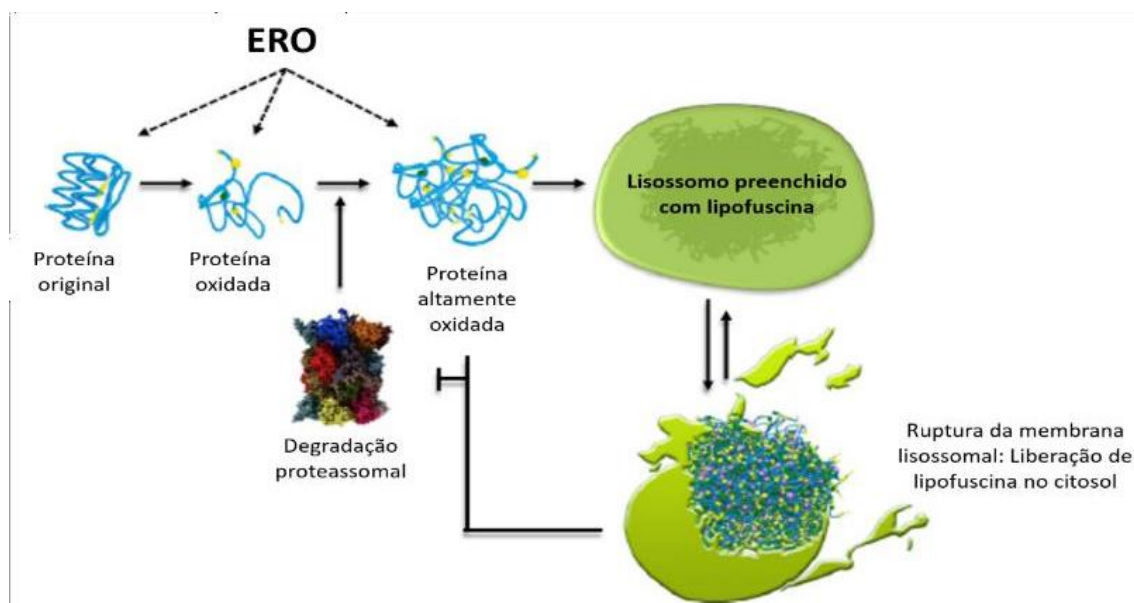
22

23

Esses sistemas vêm sendo muito bem descritos nos últimos anos, particularmente em diversas doenças que levam ao catabolismo do músculo esquelético. Tem sido demonstrado que as ERO regulam a expressão

1 gênica dos componentes básicos do proteassoma (LI et al., 2003), assim como  
2 todas as outras vias proteolíticas. No que diz respeito à caquexia pelo câncer, a  
3 perda de massa muscular pode ser devida à diminuição na síntese de  
4 proteínas, aumento no catabolismo ou combinação de ambos. Ainda que a taxa  
5 de síntese proteica esteja substancialmente diminuída na caquexia, a perda de  
6 massa muscular, parece estar diretamente relacionada com a degradação  
7 aumentada, em decorrência da ativação de vias proteolíticas. (TISDALE, 2001).

8 Além dos sistemas de degradação de proteínas interligados  
9 pela ação proteassomal, o sistema lisossomal de degradação também parece  
10 ter íntima relação com a eficiência do turnover de proteínas musculares durante  
11 a progressão de doenças. O sistema lisossomal é responsável pela remoção  
12 de organelas e pela tentativa de degradação de agregados proteicos,  
13 conhecidos como lipofuscinas. Estas moléculas foram popularizadas como  
14 “*age pigment*” e são formadas devido a modificações oxidativas extensas de  
15 proteínas, que se tornam as responsáveis pela perda da estrutura terciária de  
16 proteínas constitutivas. No interior da célula, as lipofuscinas, durante o seu  
17 processo de formação, são capazes de gerar compostos radicalares, induzindo  
18 a oxidação de novas proteínas. A presença de agregados proteicos de  
19 lipofuscina no interior das células é capaz de inibir a degradação de proteínas  
20 oxidadas por meio de ligação competitiva com enzimas proteolíticas, incluindo  
21 o proteassoma e proteases lisossomais (SITTE et al., 2000). O mecanismo de  
22 interrupção da degradação de proteínas pela formação de agregados de  
23 lipofuscina encontra-se descrito na Figura 6.



1 **Figura 6. Processo de formação dos agregados de lipofuscina.** A formação dos agregados  
 2 tem início pelo dano oxidativo proteico e na sua não remoção pelo sistema proteassomal, com  
 3 consequente englobamento pelos lisossomos. O preenchimento total desta organela e falha na  
 4 degradação, promove a ruptura de membrana e liberação de lipofuscinas no citosol.

5

## 6 1.5 ALTERAÇÕES OXIDATIVAS RELACIONADAS À MITOCÔNDRIA E AO 7 RETÍCULO SARCOPLASMÁTICO NA CAQUEXIA PELO CÂNCER

8

9 Nos últimos anos, a disfunção mitocondrial tem sido descrita  
 10 como um evento chave no desenvolvimento da caquexia pelo câncer, apesar  
 11 da heterogeneidade dos modelos usados nos estudos. Diversos trabalhos, com  
 12 distintas abordagens, têm consistentemente relatado diminuição da capacidade  
 13 oxidativa durante a perda de massa muscular relacionada ao crescimento  
 14 tumoral. A disfunção mitocondrial é comumente relacionada a caquexia pelo  
 15 câncer, independente do modelo tumoral usado no estudo. Considerando uma  
 16 maior proporção de mitocôndrias IMF do que SS (aproximadamente 80 vs.  
 17 20%, respectivamente), pode-se especular que as adaptações mitocondriais  
 18 em decorrência da caquexia pelo câncer, ocorrem preferencialmente na  
 19 população intermiofibrilar (VITORINO et al., 2015).

20

21 A manutenção da dinâmica mitocondrial é particularmente  
 22 importante em células, como neurônios, músculo cardíaco e músculo  
 23 esquelético. A este truncado mecanismo adaptativo, dá-se o nome de  
 mitoplasticidade (JOSE et al., 2012). Estudos recentes mostram que na

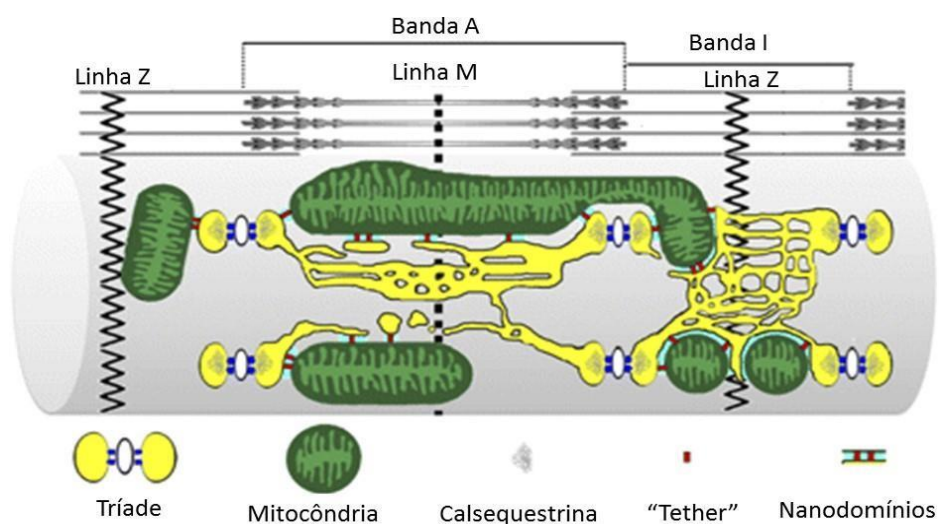
1 caquexia pelo câncer a disfunção mitocondrial é um evento comumente  
2 relatado, independente do modelo tumoral utilizado. Entretanto, ainda não se  
3 conhece a susceptibilidade de populações mitocondrial distintas frente a perda  
4 de massa muscular pelo câncer, ainda que bem estabelecido que o fenótipo  
5 muscular seja caracterizado pela redução no número de mitocôndrias e  
6 diminuição na expressão de fatores de regulação envolvidos na biogênese  
7 mitocondrial (VITORINO et al., 2015).

8 A mitocôndria e o RS interagem de forma sinérgica durante  
9 processos fisiológicos e adaptativos, no músculo estriado esquelético. Os  
10 mecanismos disparadores e reguladores desta sinergia ainda não são  
11 compreendidos. Sabe-se que a liberação de maior ou menor quantidade de  
12  $\text{Ca}^{2+}$  a partir do RS é capaz de promover mudança de posição mitocondrial em  
13 relação ao próprio RS e ao túbulo T. Alguns mecanismos bioquímicos e  
14 moleculares disparadores destas alterações fornecem algumas pistas, mas  
15 evidências sólidas ainda não foram construídas. A produção de ATP é  
16 necessária para a realização das pontes cruzadas actina-miosina, onde a  
17 ligação da molécula de ATP à miosina promove a dissociação actina-miosina.  
18 Além disso, a ATP fornece energia para a recaptação de  $\text{Ca}^{2+}$  pelas SERCA  
19 durante o relaxamento muscular. A entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  na matriz mitocondrial é  
20 responsável pela estimulação da cadeia respiratória, com consequente  
21 aumento da produção de ATP, requerido nas diversas funções celulares.  
22 Especificamente, a elevação das concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  na matriz estimula  
23 diversas desidrogenases mitocondriais responsáveis pela geração de NADH  
24 (piruvato, isocitrato e 2-oxoglutarato) e a capacidade de síntese de ATP pela  
25  $\text{F}_1\text{F}_0\text{-ATPase}$  (BONCOMPAGNI et al., 2009).

26 Estudos prévios demonstram o sequestro de  $\text{Ca}^{2+}$  pelas  
27 mitocôndrias durante a oscilação de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático em diferentes tipos  
28 celulares, incluindo células musculares. No entanto, a discrepância entre a  
29 magnitude do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  e a baixa afinidade mitocondrial pelo íon é  
30 minimizado pelo posicionamento estratégico desta organela em proximidade a  
31 fontes de fluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  e a superfície do RS. Ainda, como demonstrado por  
32 Boncompagni et al. (2009), as mitocôndrias e as unidades liberadoras de  $\text{Ca}^{2+}$   
33 estão intimamente justapostas e conectadas por cadeias eletrodensas – as  
34 chamadas “*tethers*” (Figura 7). A captura de  $\text{Ca}^{2+}$  pelas mitocôndrias deve ser

1 precisamente controlada. Excesso na entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  pode resultar na  
 2 formação do poro de permeabilidade mitocondrial, com consequente colapso  
 3 da membrana interna e liberação do citocromo, acarretando em morte celular  
 4 (DUCHEN, 2000; JOZA et al., 2001; NEWMAYER & FERGUSON-MILLER,  
 5 2003). A interação entre o RS e as mitocôndrias possui papel fundamental na  
 6 função muscular. O  $\text{Ca}^{2+}$  liberado pelo RS durante a contração muscular é  
 7 capaz de estimular a produção de ATP pelas mitocôndrias, favorecendo o  
 8 suprimento da demanda energética durante a contração muscular. Ainda, as  
 9 mitocôndrias são capazes de inibir a liberação indesejada de  $\text{Ca}^{2+}$  pelo RS,  
 10 através do controle redox local das unidades liberadoras de  $\text{Ca}^{2+}$  (CRU, do  
 11 inglês *calcium release units*).

12 Pouco se sabe sobre o real papel do RS durante os processos  
 13 atróficos, ainda que evidências apontem sua participação na modulação de  
 14 massa muscular desencadeada por ventilação mecânica, desuso e exercício  
 15 (MATECKI et al., 2016; LAMBOLEY et al., 2016; MAMMUCARI et al., 2015). No  
 16 que diz respeito à caquexia pelo câncer, nenhum estudo até o momento se  
 17 propôs a uma avaliação efetivamente sólida sobre o papel da organela frente à  
 18 ativação de vias proteolíticas e consequente perda de função.



19 **Figura 7. Relação entre RS e mitocôndrias.** Adaptado de ROSSI et al., 2011.

## 1 1.6 ANTIOXIDANTES COMO PROPOSTA TERAPÊUTICA NA CAQUEXIA 2 PELO CÂNCER

3  
4 Segundo o Consenso Brasileiro de Caquexia/Anorexia (2011), os  
5 tratamentos clínicos disponíveis para a síndrome da caquexia destinam-se ao  
6 aumento da ingestão alimentar. Como a maioria dos estudos controlados  
7 randomizados não tem demonstrado benefícios consistentes da intervenção  
8 nutricional isolada no ganho de peso e na qualidade de vida, o tratamento da  
9 caquexia passou a ser associado ao uso de grande variedade de agentes  
10 farmacológicos, cujo objetivo principal é obter melhora na qualidade de vida do  
11 paciente oncológico. No entanto, poucos estudos avaliam o aumento da  
12 sobrevivência destes indivíduos.

13 Os tratamentos em voga, apesar de pouco utilizados e de  
14 apresentarem resultados pouco consistentes, dividem-se em: (1) estimulantes  
15 do apetite; (2) anti-inflamatórios; e (3) modificadores do metabolismo energético.  
16 Dentre os estimulantes do apetite, encontram-se o magesrol, a  
17 mirtazapina, o cloridrato de ciproetadina e os canabíoides. Dentre os  
18 anti-inflamatórios, encontram-se a dexametasona, a talidomida, a pentoxifilina, a  
19 indometacina, o naproxeno e o celecoxibe. Finalmente, dentre a classe dos  
20 modificadores do metabolismo energético encontram-se o cipionato de  
21 testosterona e os nutracêuticos, como o ômega-3, a L-carnitina, a leucina, o  
22 hidroximetilbutirato (um dos mais utilizados em ambiente hospitalar) e a  
23 melatonina. Todos estes compostos citados como nutracêuticos possuem  
24 alguma capacidade antioxidante, o que parece evidenciar um alvo terapêutico  
25 interessante para tratamento efetivo desta síndrome negligenciada  
26 (CONSENSO BRASILEIRO DE CAQUEXIA/ANOREXIA, 2011).

27 O aumento na produção de ERO além de níveis basais pode  
28 ser balanceado por um sistema endógeno de defesas antioxidantes naturais.  
29 Dentre as enzimas, destacam-se a superóxido dismutase (SOD), catalase e  
30 glutatona peroxidase (GSH-Px). Estas são capazes de impedir a ocorrência de  
31 reações em cadeia pelas espécies químicas e são consideradas o principal  
32 mecanismo de defesa antioxidante (MASELLA, 2005). A alimentação pode ser  
33 fonte de antioxidantes como as vitaminas C e E, flavonoides e carotenoides.  
34 Proteínas como ceruloplasmina, transferrina e ferritina podem atuar, também,

1 como antioxidantes, bem como os metabólitos bilirrubina e ácido lipóico  
2 (HONH, 2013).

3 A N-acetilcisteína (NAC) é associada ao tratamento de doenças  
4 pulmonares com hipersecreção de muco, como bronquite crônica e fibrose  
5 císticas, além de ser o tratamento de escolha na intoxicação por paracetamol  
6 (MOLDÉUS & COTGREAVE, 1994; SHIMIZU et al., 2005). O grupamento tiol  
7 presente em sua estrutura confere-lhe capacidade antioxidante direta, através  
8 do sequestro de ERO presentes no meio (TERRIL et al., 2011). A NAC ao ser  
9 metabolizada é desacetilada sendo convertida a cisteína, que no interior da  
10 célula irá se conjugar com os aminoácidos glicina e ácido glutâmico, formando  
11 glutathione reduzida (GSH), exercendo efeito antioxidante indireto (RUFFMANN  
12 et al., 1991). Estudos têm apontado para o envolvimento do sistema  
13 antioxidante da glutathione na regulação de algumas reações endógenas  
14 (COTGREAVE et al., 2002).

15 A NAC parece atuar como antioxidante indireto nas fibras do  
16 músculo esquelético pela proteção de sítios celulares específicos, como RS,  
17 sarcolema e/ou proteínas mitocondriais, do estresse oxidativo severo em  
18 diferentes modelos (SHINDOH et al. 1990; REILLY et al. 1991; VAN SURELL  
19 et al. 1992; KHAWLI & REID, 1994; REID et al. 1994; BARREIRO et al. 2005).  
20 Ainda, a administração de NAC foi eficaz na melhora significativa da atividade  
21 do complexo IV mitocondrial no músculo de animais caquéticos.  
22 (FERMOSELLE et al., 2013).

23 Evidências recentes têm demonstrado a eficácia da NAC na  
24 reversão da perda de massa muscular esquelética na atrofia por desuso,  
25 induzida experimentalmente (DOWLING, 2012), já que outros estudos vêm  
26 indicando o envolvimento do estresse oxidativo em processos catabólicos  
27 (POWERS et al., 2009; BONNETO et al., 2009; POWER et al., 2012).

## 2 JUSTIFICATIVA

O diagnóstico de caquexia em pacientes com câncer é um estado frequentemente negligenciado na prática clínica, apesar de exercer óbvia influência sobre a qualidade de vida, sobrevida e mortalidade de indivíduos portadores de neoplasias. Dos poucos indivíduos diagnosticados, uma porcentagem ainda menor é tratada. Estudos demonstram que células tumorais são capazes de promover anormalidades metabólicas que culminam em sinalização e adaptação à distância no músculo estriado esquelético, conhecida como caquexia. Contudo, a mitocôndria e o RS, por interferirem diretamente no equilíbrio do  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático livre, têm recebido pouca atenção no mecanismo de desenvolvimento da doença, principalmente nas suas fases iniciais – que parecem ter fundamental importância para o efeito terapêutico. Estudos têm sugerido plasticidade mitocondrial no desenvolvimento da sarcopenia senil, fato que sugere mudança de posicionamento e adequação da organela frente a desafios que modulem a massa muscular. Pouco se sabe sobre a real participação da interação entre mitocôndria e RS em doenças de componente caquético. Além disso, a falta de opções terapêuticas realmente eficientes durante o desenvolvimento da síndrome afeta diretamente a opção de tratar o paciente em estágios precoces. O estado de astenia do paciente é forte determinante, inclusive, da dose, frequência, e do quimioterápico de escolha. A nutracêutica, dentre as opções terapêuticas disponíveis, vem sendo utilizada na tentativa de melhora do estado geral do indivíduo, o que impactaria diretamente na sobrevida. Todos os nutracêuticos utilizados na prática clínica possuem em alguma extensão, capacidade antioxidante, o que torna esta classe de substâncias potenciais terapêuticos para o tratamento da síndrome. Seus efeitos durante a fase precoce da caquexia pelo câncer ainda não foram testados, assim como os mecanismos determinantes da adaptação muscular antes que a atrofia efetivamente aconteça.

### 1 3 OBJETIVOS

2

#### 3 3.1 OBJETIVOGERAL

4

5 Avaliar a plasticidade mitocondrial e do RS em músculos  
6 esqueléticos com diferentes tipos de fibras, de ratos Wistar portadores da  
7 forma sólida do tumor de Walker-256, assim como investigar o envolvimento do  
8 estresse oxidativo nestas alterações, por meio do tratamento com um  
9 antioxidante que tem demonstrado atuar positivamente sobre a atrofia por  
10 desuso.

11

#### 12 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

13

- 14 1. Classificar o nível de caquexia, após 5 dias de implantação da forma sólida  
15 do tumor de Walker-256;
- 16 2. Avaliar se a adaptação muscular, neste modelo, acomete  
17 predominantemente músculos glicolíticos ou oxidativos;
- 18 3. Verificar se as modificações adaptativas precoces estão correlacionadas às  
19 alterações mitocondriais ou de RS por meio de análise de ultraestrutura;
- 20 4. Investigar a correlação das alterações específicas de organelas com as  
21 modificações oxidativas de proteínas indutoras de proteólise muscular;
- 22 5. Avaliar se o antioxidante N-acetilcisteína seria capaz de alterar as  
23 modificações iniciais evidenciadas nos objetivos específicos anteriores.

1 **ARTIGO**

2

3

4

5

6

7

Associação entre perda de massa muscular fibra-específica e  
anormalidades ultra estruturais e oxidativas, em um modelo experimental de pré-  
caquexia induzida pelo câncer.

10

11

12

Specific fiber type wasting is associated with ultrastructure  
abnormalities and alterations of oxidative stress parameters in an experimental model of  
cancer-induced precachexia.

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31 O presente artigo será submetido ao periódico científico “The Journal of Cachexia,  
32 Sarcopenia and Muscle (JCSM)”.

33 F.I. 2015: 7.883 / Qualis CAPES 2014 (Medicina II): A1.

1 **SPECIFIC FIBER TYPE WASTING IS ASSOCIATED WITH**  
2 **ULTRASTRUCTURE ABNORMALITIES AND ALTERATIONS OF**  
3 **OXIDATIVE STRESS PARAMETERS IN AN EXPERIMENTAL MODEL OF**  
4 **CANCER-INDUCED PRECACHEXIA**

5

6 Fernanda Paschoal Blegniski<sup>1</sup>; Simona Boncompagni<sup>2</sup>; Claudia Pecorai<sup>2</sup>; Rubens  
7 Cecchini<sup>3</sup>; Feliciano Protasi<sup>2</sup>; Flávia Alessandra Guarnier<sup>1</sup>

8

9 <sup>1</sup> Pathophysiology Laboratory of Muscular Adaptations, Department of Pathological  
10 Sciences, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Brazil

11 <sup>2</sup> Center for Research on Ageing and Department of Neuroscience and Imaging,  
12 Università G. d'Annunzio, Chieti, Italy

13 <sup>3</sup> Pathophysiology Laboratory of Free Radicals, Department of Pathological Sciences,  
14 Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Brazil

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26 **Corresponding author:**

27 Flávia Alessandra Guarnier

28 Pathophysiology Laboratory of Muscle Adaptations

29 Department of Pathological Sciences

30 Londrina State University

31 E-mail: faguarnier@uel.br, faguarnier@yahoo.com.br

32 Phone: +55 43 3371 45 21

33 86051- 990 Londrina, Brazil

1

**ABSTRACT**

2 Muscle wasting during cancer cachexia progression does not occur similarly in all types  
3 of muscle fibers. The purpose of this study was to investigate EDL and soleus  
4 ultrastructural changes related to mitochondria and sarcoplasmic reticulum (SR), and  
5 correlation with oxidative stress profile in a very early stage of cachexia induced by  
6 Walker-256 solid tumor. Oxidative stress parameters was quantified. Mitochondria, SR  
7 and cross sectional area quantitative analysis were traced. Tumor implantation caused  
8 decrease in general body weight, followed by a significant weight loss in EDL muscle (-  
9 15.33%), contrasting with the small loss demonstrated by soleus (-5.14%) muscle. Cross  
10 sectional area revealed atrophic fibers in soleus and EDL. Soleus GSH levels were  
11 significantly lower in tumor group (T5) ( $5.04 \pm 0.78$  mmol/mg protein) when compared  
12 with control group (C5) ( $7.49 \pm 2.34$ ). EDL showed a significant increase in T5  
13 chemiluminescence curve, but not in soleus. EDL and soleus muscles presented no  
14 alterations in carbonyl groups content. SR volume area decrease in T5 group, both in  
15 EDL (18.89%) and soleus muscle (22.09%) compared to C5. However, only EDL fibers  
16 from T5 showed significantly reduced mitochondrial volume. In addition, mitochondria  
17 are more fragmented in T5 group. Analyzed parameters were significantly modified in  
18 animals treated with N-acetylcysteine. In conclusion, during pre-cachexia stage, muscle  
19 mass loss followed by oxidative and ultrastructural changes occurs primarily in muscle  
20 with predominant glycolytic metabolism. However, RS adaptation can be observed in  
21 soleus muscle, regardless muscle waste or oxidative alteration.

22

23 **Key words:** Mitochondria. Sarcoplasmic reticulum. Soleus. EDL. Cachexia. Oxidative  
24 stress.

## 1 INTRODUCTION

2  
3 Although cachexia has a profoundly adverse effect on the quality of  
4 life and survival of patients, weight loss is rarely recognized or managed actively. Only  
5 2.4% of all patients with cancer are diagnosed with cachexia. The treatment of the  
6 syndrome is observed in only 6.4% of this population (SARHILL, et al. 2003). Patients  
7 with severe muscle wasting, ongoing catabolism, and low performance status are  
8 unlikely to have clinically important benefits from treatments intended to result in gain  
9 of lean tissue and function. In accordance with international cachexia consensus, the  
10 severity of depletion can be classified according to the rate of ongoing loss in  
11 combination with depletion of energy stores and body protein mass. Pre cachexia, the  
12 initial and often barely perceptible beginning of cachexia trajectory, is classified as an  
13 involuntary weight loss (i.e.,  $\leq 5\%$ ) preceded by metabolic alterations and anorexia  
14 (FEARON, 2006).

15 Muscle mass loss, the preeminent characteristic of cachexia, arises  
16 through a combination of hypoanabolism, with increased catabolism of myofibrillar  
17 proteins (TISDALE, 2010). However, muscle wasting during cancer cachexia  
18 progression does not occur similarly in all types of muscle fibers (BARACOS, et al.  
19 1995; ACHARYYA, et al., 2004). The different fiber types display a diverse  
20 susceptibility to atrophy, with oxidative muscle fibers more resistant to atrophy than  
21 glycolytic fibers (LI, et al, 2007). Some studies indicate metabolic and structural  
22 adaptations in atrophying muscle (SANDRI, 2008; FONTES-OLIVEIRA, et al. 2012),  
23 although few studies have proposed a consistent comparison of muscles with different  
24 fiber types in early stages of cachexia.

25 Oxidative stress has been proposed to be involved in the pathogenesis  
26 of skeletal muscle wasting in multifaceted ways (BONNETO et al., 2009). Reactive  
27 oxygen species (ROS) have been suggested to play a significant role in activating at  
28 least some of the mechanism leading to cancer cachexia (LAVIANO et al., 2007).  
29 Target molecules of ROS can be membrane lipids, structural and regulatory proteins, or  
30 nucleic acids, and these reactions could potentially damage cell structures and functions  
31 (MARTIN & BARRETT, 2002). In addition, the modifications imposed by ROS  
32 interactions have the potential of modifying cellular structures, altering their functions.  
33 In this sense, mitochondria are extremely dynamic organelles, and abnormalities in  
34 muscle mitochondrial morphology and function have been reported in cancer-induced

1 cachexia (FONTES-OLIVEIRA, et al. 2012; CONSTANTINOU, et al. 2011). This  
2 organelle exists as either fused, tubular networks or as fragmented granules, depending  
3 on cellular state, including mitochondrial metabolism, respiration, and oxidative stress  
4 (MISHRA & CHAN, 2016). Several studies have demonstrated mitochondrial network  
5 fragmentation on the skeletal muscle during cancer development, with pathological  
6 consequences (BROOKES, et al. 2004; SENFT & RONAI, 2016).

7           It has been demonstrated that mitochondria and sarcoplasmic  
8 reticulum (SR) have key roles during normal muscle activity (DIRKSEN, 2009). These  
9 two organelles possess a structural association that provides an optimal bidirectional  
10 SR-mitochondrial communication that improves  $Ca^{2+}$  release and excitation-contraction  
11 coupling during skeletal muscle activity (ROSSI, et al. 200). Although SR-  
12 mitochondrial communication has positive effects (FONTES-OLIVEIRA et al., 2012),  
13 this communication needs to be regulated appropriately (e.g., by structural proximity),  
14 and any perturbation in the mitochondrial or SR homeostasis (or membrane integrity)  
15 might severely impair cellular functions such as ATP synthesis, permeability of  
16 transition pores, and additional ROS generation (BROOKES et al., 2004). As a result of  
17 the close proximity to SR, significant mitochondrial  $Ca^{2+}$  uptake has been demonstrated  
18 (DIRKSEN, 2009). Since disturbances on  $Ca^{2+}$  balance can activate several mechanisms  
19 of signaling, damage, or even cellular death, this could explain, at least in part,  
20 weakness and asthenia demonstrated by cachectic patients during disease evolution.

21           At present, current literature refers that cancer progression promotes  
22 mitochondrial functional and morphological abnormalities in the skeletal muscle. Yet,  
23 no study evaluates in-depth disruption of mitochondrial networks associated with  
24 alterations in other structures, such as sarcoplasmic reticulum in different muscles with  
25 diverse fiber types, as well as the relationship with oxidative modifications in the early  
26 stages of the cachexia syndrome. Few information is provided about SR role and  
27 behavior during cachexia development, and also the importance of this organelle on the  
28 already described mitochondrial adaptation. Therefore, the purpose of this study is to  
29 investigate extensor digitorum longus (EDL) and soleus ultrastructural changes related  
30 to mitochondria and SR, and also the correlation with oxidative modifications in a very  
31 early stage of cachexia induced by Walker-256 tumor.

## 1 **METHODS**

2

### 3 **Animals**

4

5                   Adult male Wistar rats (190-230g), obtained from the animal house of  
6 the Biological Sciences Center at the Universidade Estadual de Londrina were used.  
7 The animals were kept at a constant temperature ( $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) and under an automatically  
8 controlled photoperiod (12 h light/12 h dark) with free access to water and commercial  
9 food (Nuvilab®, Nuvital Nutrientes Ltda., Curitiba-PR, Brazil). The food intake and  
10 weight were controlled daily. In all respects, the protocols conformed to the Guide for  
11 the Care and Use of Laboratory Animals [DHEW Publication No. (NIH) 86-23, revised  
12 1985, Office of Science and Health Reports, DRR/NIH, Bethesda, Maryland]. In  
13 addition, procedures were approved by Ethics Committee for Animal Experimentation  
14 from our institution (069/2015 and 143/2016).

15

### 16 **Tumor implantation and treatment**

17

18                   The rats were divided into three groups, designated as controls (C5);  
19 tumor bearing rats (T5), and tumor hosts treated with N-acetylcysteine (T5NAC - 1% in  
20 drinking water). The former group received 0.5 mL injection of phosphate-buffered  
21 saline (PBS), the second groups received a Walker-256 cell suspension ( $8 \times 10^7$  cells in  
22 0.5 mL of PBS) injected subcutaneously into the right hindlimb flank, and the final  
23 group received the same cell suspension plus treatment with NAC. Tumor cells were  
24 maintained intraperitoneally in our laboratory as an ascitic intraperitoneal tumor. At the  
25 moment of inoculation, cells were removed from the peritoneal cavity as described by  
26 Guarnier et al. (2010). Briefly, after removal with 8 uL/mL of 5000 IU/mL heparin,  
27 tumor cells were centrifuged at  $1000 \times g / 4^{\circ}\text{C}$ . Intermediate cell phase was collected  
28 and the percentage of viable cells was determined by trypan blue dye exclusion method  
29 (nonviable cells stained blue), using a Neubauer chamber.

30

### 31 **Characterization of physiological parameters and cachexia classification**

32

33                   In order to determine cachexia stage (FEARON et al., 2006), food  
34 intake, body weight and temperature were controlled daily in all groups. Handgrip

1 strength test was performed with a commercial digital grip force meter (EEF 305 Grip  
2 Strength Meter, Insight) and animals were familiarized with the device and procedures  
3 for 4 days previously the implantation. After tumor implantation, all animals were  
4 exposed to the grip force test daily. The mean of four consecutive trials was recorded in  
5 grams and further normalized by body weight (MEYER et al., 1979).

6                   Body mass index (BMI), an anthropometrical parameter, is defined as  
7 body weight in grams divided by the square of the nose–anus length in centimeters  
8 ( $\text{g}/\text{cm}^2$ ). The measurements were taken in the anaesthetized animals, before euthanasia  
9 (NOVELLI et al., 2007).

## 10 11 **Tissue preparation**

12  
13                   Five days after subcutaneous tumor implantation or PBS  
14 administration, animals in both groups were weighed and euthanized by decapitation.  
15 The period of euthanasia was determined based on previous observations of our group,  
16 pointing that 5 days corresponded to one third of maximal survival time. 5 days, though,  
17 can be considered an early stage of cachexia. The contralateral gastrocnemius, soleus  
18 and EDL muscles were quickly excised, weighed and divided. One portion was frozen  
19 in liquid nitrogen and stored at  $-86^\circ\text{C}$  until use for biochemical assays, and the other  
20 portion was fixed and kept in 4% glutaraldehyde in 0.1M Na-cacodylate buffer  
21 (NaCaCo) until further use, as described above. The tumor was carefully excised and  
22 weighed. Retroperitoneal adipose tissue was removed in all groups and then discarded.

23                   For the oxidative stress analysis, soleus and EDL muscles from C5,  
24 T5 and T5NAC were prepared as described by Guarnier et al. (2010). Muscles were  
25 placed on ice and homogenized on a single cycle of 45 seconds in an Ultraturrax  
26 homogenizer (Marconi<sup>®</sup> - MA102/mini) containing the appropriate buffer. Total  
27 homogenate was used for the tert-butyl hydroperoxide-stimulated chemiluminescence.  
28 The supernatant from total homogenate was obtained by centrifugation at  $11,300 \times g$  for  
29 15 min at  $4^\circ\text{C}$ , from a homogenate containing 50 mg of tissue per milliliter of buffer,  
30 and used for glutathione assay. For total protein carbonylation, tissues were specially  
31 treated according to the method described by Reznick and Packer (1994), with  
32 adaptations as described later.

## 1 **Oxidative stress analysis**

### 3 **Measurement of tert-butyl hydroperoxide-initiated**

4 **chemiluminescence** - In order to determine lipid hydroperoxide levels, or oxidative  
5 membrane modifications, a sensitive chemiluminescence assay initially reported by  
6 Gonzalez-Flecha (1991) was used. The reaction initiated by tert-butyl hydroperoxide  
7 induces sample non-enzymatic antioxidants consumption, which results in increased  
8 photo emission. An increased in chemiluminescence assay is related to oxidative stress  
9 previously suffered by the tissue. Homogenate (15 mg/mL in 10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$   
10 buffer) was used after a 150 x g centrifugation. Addition of 6 mM tert-butyl  
11 hydroperoxide initiated chemiluminescence reaction. The assay was carried out in a  
12 dark room at  $35 \pm 1^\circ\text{C}$ . For each sample, a 30 minutes curve was obtained by  
13 interpolation, which each point representing the differential smoothing of 600 readings.  
14 The area under chemiluminescence curve was extracted by integral calculus of each  
15 animal curve. The results are expressed in relative light units per SR volume.

16 **Carbonyl Protein Content** - Protein carbonyl groups are  
17 consequence of protein oxidation and consequently degradation. DNPH tagging of  
18 protein carbonyls has been one of the most common measures of oxidative stress. The  
19 carbonyl protein content was measured using the principle described by Reznick and  
20 Parker (1994), with modifications. Muscle samples (50 mg/mL) were homogenized in  
21 50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  buffer, 1 mM ethylenediamine tetraacetic acid, pH 7.4. The  
22 homogenized tissues were centrifuged at 130 x g for 10 minutes at  $4^\circ\text{C}$ . A volume of  
23 200  $\mu\text{L}$  of 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) were added to 200  $\mu\text{L}$  of supernatant  
24 and incubated at room temperature. After 30 minutes incubation, 100% trichloroacetic  
25 acid (TCA) were added, placed on ice for 5 minutes, and spined at maximum speed for  
26 2 minutes. Supernatant was removed and discarded without disturbing pellet. Pellets  
27 were then washed with cold acetone and placed at  $-20^\circ\text{C}$  for 5 minutes. Acetone was  
28 removed and pellets were dissolved in 2 mL 6M guanidine hydrochloride and read at  
29 375 nm. To calculate the protein carbonyl content, the following formula was used:  $C =$   
30  $[(\text{OD } 375 \text{ nm})/6.364] \times (100)$  nmol/well, were 6.364 is the extinction coefficient using  
31 the enclosed 96 well plate in mM ( $= 22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1} \times 0.2893 \text{ cm}$  path length in well).  
32 The results were expressed as nmol carbonyl per milligram of total protein.

33 **Glutathione Assay** - Soleus and EDL muscles (50 mg/mL) from all  
34 three groups were homogenized in 10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  buffer, pH 7.4. Samples were

1 centrifuged at  $11.300 \times g$  for 15 minutes at  $4^{\circ}\text{C}$ , to obtain a supernatant containing  
2 glutathione. In order to determine redox imbalance, the levels of total (GSH)  
3 glutathione were determined by tritration with 5,5'-dithio-bis (2-nitrobenzoic acid)  
4 (DTNB), evidenced by a yellow color formation. Oxidized glutathione (GSSG) was  
5 determined in the same manner in the supernatant previously incubated with 4-vinyl-  
6 pyridine for 60 min at room temperature, according to the method described by Tietze  
7 (1969). The rate of TNB formation is proportional to GSH concentration in the sample,  
8 measured at 412 nm. The results were expressed in millimoles per milligram of protein.

9 **Total protein concentration** – For data normalization, total protein  
10 concentration was determined by the method of Lowry et al. (1951) modified by Miller  
11 (1959) or determined using ultraviolet absorption at 280 nm in order to determine the  
12 amount of protein per sample. Bovine serum albumin (BSA) was used as a standard.

#### 14 **Light and electron microscopy (EM) of EDL and soleus muscle fibers**

15  
16 Soleus and EDL were dissected from sacrificed animals, and small  
17 muscle pieces were pinned on a dish, fixed at room temperature with 4% glutaraldehyde  
18 in 0.1 M Na-Cacodylate buffer (NaCaCo, pH 7.2) and stored in the fixative at  $4^{\circ}\text{C}$ .  
19 Small bundles of fixed muscle were then post-fixed, embedded, stained en-block, and  
20 sectioned for EM, as described previously (Boncompagni et al., 2009a; Boncompagni et  
21 al., 2009b; Squecco et al, 2009). Briefly, samples were post fixed in 2%  $\text{OsO}_4$  for 2  
22 hours, and overnight block-stained in aqueous saturated uranyl acetate ( $\text{UO}_3\text{OCOCH}_3$ )<sub>2</sub>.  
23 Dehydration was followed with progressive ethanol washes and acetone. Samples were  
24 embedded in Epon 812 resin.

25 For histological analysis, 800 nm thick cross sections were stained in a  
26 solution containing 1% toluidine blue O and 1% sodium tetraborate in distilled water for  
27 2 minutes on a hot plate at  $55\text{-}60^{\circ}\text{C}$ . After washing and drying, sections were mounted  
28 with mounting medium (DPX Mountant for Histology, SIGMA) and observed with a  
29 Leica DMLB light microscope (Leica Microsystem, Germany). For EM, ultrathin  
30 sections ( $\sim 45$  nm) were cut in a Leica Ultracut R microtome (Leica Microsystem,  
31 Vienna, Austria) using a Diatome Diamond knife (Diatome Ltd. CH-2501 Biel,  
32 Switzerland). After staining in 4% uranyl acetate and lead citrate, sections were  
33 examined with a Morgagni Series 268D electron microscope (FEI Company, Brno,  
34 Czech Republic), equipped with Megaview III digital camera (Munster, Germany).

## 1 **Quantitative analysis of images**

2  
3 **Electron Microscopy** - Micrographs of non-overlapping regions were  
4 randomly collected from transversal sections of internal fiber areas. Estimation of  
5 relative fiber volume occupied by intermyofibrillar mitochondria (7,100 x  
6 magnification) and SR (8,900 X magnification) was measured in transversal sections by  
7 using the stereology point and intersections counting method as described elsewhere  
8 (Mobley & Eisenberg, 1975). Briefly, a minimum of 20 micrographs/muscle were taken  
9 at the specific magnification from cross sections, excluding nuclei and subsarcolemal  
10 regions. Two different types of grids were superimposed to each image: (1) an  
11 orthogonal array of dots at a spacing of 0.35  $\mu\text{m}$  and (2) a grid of lines arranged in two  
12 orthogonal arrays, separated by a distance of 0.61  $\mu\text{m}$ . The ratio of numbers of dots  
13 falling over a mitochondrion or SR to the total number of dots covering the image was  
14 used to approximate relative volume occupied by mitochondria or SR. (Mobley &  
15 Eisenberg, 1975). To estimate mitochondrial surface area, the frequency of intersections  
16 between the external profile of the sectioned mitochondria and the grid lines was  
17 counted. The ratio of mitochondrial surface area to total fiber volume ( $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$ ) was  
18 obtained from the formula  $C/2d \cdot P_{\text{test}}$ , where C is the number of intersections between  
19 the grid lines and the mitochondria, d is the spacing between the grid lines, and  $P_{\text{test}}$  is  
20 the number of grid line intersections in the test area. The denominator,  $2d \cdot P_{\text{test}}$ , equals  
21 the total length of grid lines in the test grid (Knollmann et al., 2006). To evaluate the  
22 extent of mitochondrial network we estimated size (surface area) and length (along the  
23 long axis) of each individual mitochondrion using the Megaview III digital camera and  
24 AnalySIS software (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Munster, Germany) by  
25 manually tracing mitochondria outlines as previously described (AINBINDER et al.,  
26 2015). Aspect ratio (AR) is computed as [major axis/minor axis] and reflects the length-  
27 to-width ratio (considered fusion index); form factor (FF) [ $\text{perimeter}^2/4\pi\text{surface area}$ ]  
28 reflects the branching aspect of mitochondria (considered fission index). Computed  
29 values were imported into GraphPad Prism 6 software (GraphPad Software Inc., San  
30 Diego, USA) for data analysis.

31 **Muscle fiber morphometry** – To establish a histological parameter  
32 of muscle adaptation, the cross sectional area of fibers was measured. Slides  
33 identifications were covered, and muscle images were captured, (approximately 100  
34 measured fibers/animal), using an optical microscope (200  $\times$  magnification). Images

1 were obtained using a high-resolution camera coupled to the microscope. An image  
2 analysis system (Image-Pro-Plus 4.0; Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA) was  
3 used to determine fiber area in squared micrometers. The frequency distribution was  
4 estimated based on area intervals, and percentiles determined to quantify the changes  
5 between groups. As there is a natural heterogeneity in the fiber size distribution within  
6 groups, values were grouped by procedure (C5, T5 e T5NAC) and frequency of  
7 distribution was estimated based on area intervals (31 bins) from 2 to 31  $\mu\text{m}^2$ .

## 9 **Statistical analysis**

11 Normality test was conducted by D'Agostino-Pearson omnibus  
12 test. Parametric values were compared by One-way ANOVA followed by Tukey post  
13 test. Non-parametric values were compared using Kruskal–Wallis test followed by  
14 Dunn's multiple comparison. Mitochondrial quantitative analysis, core temperature and  
15 hand grip strength test were compared by Student's t-test. Comparison between groups  
16 in multiple time point analysis, as curves of chemiluminescence induced by tert-butyl  
17 hydroperoxide were compared by two-way ANOVA. For the muscle morphometry data,  
18 histograms of the fiber cross-sectional areas were constructed and absolute frequencies  
19 calculated. All statistical analysis were carried out using the GraphPad Prism 6 software  
20 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA). Differences were considered statistically  
21 significant for  $P$  values  $< 0.05$ .

## 23 **RESULTS**

### 25 **Characterization of cachexia, body, skeletal muscle mass and adipose tissue loss**

27 In order to establish which stage of cachexia we were evaluating, the  
28 percentage of general body mass loss within the experimental period (indicative of  
29 weight loss), hand grip test (indicative of mass loss), food intake (indicative of  
30 anorexia), and temperature (indicative of metabolic changes) were monitored. Figure 1  
31 shows characterization of cachexia stage 5 days after the implantation of Walker-256  
32 solid tumor. While the control group presented, in the time interval of 5 days, a weight  
33 gain of  $10.51 \pm 2.78\%$  when compared to its initial weight, tumor-bearing animals  
34 showed loss of  $2.77 \pm 9.11\%$  of general body wasting ( $p < 0.05$ , Figure 1A). Although

1 not demonstrated in the graph bar, treatment with N-acetylcysteine 1% *ad libitum*  
 2 partially prevented the development of general body mass loss ( $5.12 \pm 5.91\%$ ). In  
 3 addition, food intake progressively decreased during tumor development. C5 group kept  
 4 a regular amount of food consumed during the five days (from  $23.06 \pm 1.8$  on day 1 to  
 5  $22.75 \pm 1.0$  g/day/animal on day 5), whereas T5 achieved 16.49% lower consumption  
 6 on the 5th day (from  $22.37 \pm 0.75$  on day 1 to  $18.68 \pm 1.43$  g/day/animal on day 5;  
 7  $p < 0.05$ ; Figure 1B). The core temperature revealed also decreased values when C5 and  
 8 T5 were compared ( $p < 0.05$ ). Tumor-bearing rats had mean lower temperature during  
 9 almost the entire experimental time course (from  $35.70 \pm 0.18$  °C on day 1 to  $35.85 \pm$   
 10  $0.26$  °C on day 5) when compared to C5 (from  $34.91 \pm 0.16$  °C on day 1 to  $35.40 \pm$   
 11  $0.022$  °C on day 5). Figure 1C shows core temperature expressed by delta ( $\Delta$ ),  
 12 calculated by subtracting the zero-time mean measurement from the mean measurement  
 13 (indicated time points) after tumor implantation. Hand grip strength showed no  
 14 significant ( $p > 0.05$ ) difference in five days, or even when C5 (from  $1.92 \pm 0.11$  on day  
 15 1 to  $2.34 \pm 0.42$  HGT(g)/weight(g) on day 5) was compared to T5 ( $2.12 \pm 0.32$  on day 1  
 16 to  $1.99 \pm 0.21$  HGT(g)/weight(g) on day 5; Figure 1D). Yet, BMI did not present any  
 17 difference in the comparison C5 ( $0.49 \pm 0.02$  g/cm<sup>2</sup>) versus T5 ( $0.49 \pm 0.01$  g/cm<sup>2</sup>;  
 18 Figure 1E). When placed together, these results allowed the classification of cachexia  
 19 stage as pre-cachexia, considering the parameters described elsewhere (FEARON et al.,  
 20 2006): weight loss  $\leq 5\%$ , anorexia, and apparent metabolic changes.

21 Results from muscle, tumor and adipose tissue weights are showed on Table 1.  
 22 From the muscles collected, the most sensitive to cachexia was the EDL that showed  
 23 significant reduction of 15.33% on wet weight when compared to control (from  $98.34 \pm$   
 24  $6.7$  on C5 to  $83.26 \pm 17.33$  mg on T5,  $p < 0.05$ ). Gastrocnemius (-10.30%) and soleus (-  
 25 5.14%) muscles showed a discreet muscle mass reduction when compared to C5, but no  
 26 statistical significance was found. Gastrocnemius muscle was used only as a parameter  
 27 of mixed fiber type muscle loss. On EDL, muscle weight loss was partially (and  
 28 significantly) protected by treatment with NAC 1% ( $94.9 \pm 9.2$  mg,  $p = 0.05$ ). Similarly,  
 29 gastrocnemius (from  $1001 \pm 154.3$  on T5 to  $1089 \pm 90.63$  mg on T5NAC) and soleus  
 30 (from  $199.2 \pm 32.4$  for T5 to  $207.9 \pm 22.9$  mg for T5NAC) muscles showed some  
 31 protection, but also not significant. With respect to tumor size, no statistical difference  
 32 was found between T5 ( $4.62 \pm 1.87$  g) and T5NAC ( $5.30 \pm 2.14$  g). In the same way,  
 33 after 5 days of tumor implantation, tumor presence did not interfere significantly in the  
 34 retroperitoneal adipose tissue content.

## 1 Cross sectional area

2  
3 The frequency of distribution of EDL and soleus muscles cross  
4 sectional area are presented in Figures 2, respectively. In EDL muscle the 90<sup>th</sup> (P<sub>90</sub>)  
5 percentile (i.e. up to 90% of total measured areas) occurred in the 17<sup>th</sup> bin (P<sub>90</sub> = 18.14  
6  $\mu\text{m}^2$ ) for C5 group, while in T5 group P<sub>90</sub> was 12.57  $\mu\text{m}^2$  and demonstrated to be  
7 located at 11<sup>th</sup> bin. As expected, soleus muscle showed to suffer less the stimuli for  
8 atrophy triggered by cachexia. The P<sub>90</sub> was 20.99  $\mu\text{m}^2$  and occurred at 18<sup>th</sup> bin for C5,  
9 and was 17.55  $\mu\text{m}^2$  on the 15<sup>th</sup> bin for T5. NAC treatment reinforced the results  
10 obtained from wet weight. EDL showed a P<sub>90</sub> of 14.23  $\mu\text{m}^2$  (partial atrophy protection)  
11 with the value ascending to the 13<sup>th</sup> bin, while soleus treated with NAC demonstrated a  
12 P<sub>90</sub> of 20.05  $\mu\text{m}^2$ , returning to the same bin as control group. Yet, it can be seen that  
13 soleus fibers has generally a larger area when compared to EDL, in all groups.

## 15 Oxidative Stress Parameters

16  
17 Alterations in the production of reduced glutathione (GSH) and the  
18 differential redox balance in soleus and EDL were determined by the levels GSH and  
19 oxidized glutathione (GSSG). Data are presented in figures 3A and B. In EDL, nor GSH  
20 or GSSG levels were significantly different among groups. In contrast, soleus GSH  
21 levels were significantly lower in T5 ( $5.04 \pm 0.78$  mmol/mg protein) when compared to  
22 C5 ( $7.49 \pm 2.34$  mmol/mg protein,  $p < 0.05$ ). In addition, in EDL, T5NAC ( $4.02 \pm 0.18$   
23 mmol/mg protein) did not demonstrate statistical difference when compared to T5,  
24 although significance in the comparison to C5 was maintained. However, soleus GSSG  
25 showed any significant difference within groups.

26 When levels of oxidatively modified proteins were evaluated by the  
27 amounts of carbonylated proteins, EDL muscle did not presented any differences in the  
28 comparison between C5 group ( $2.89 \pm 0.63$  nM carbonyl proteins/mg total protein)  
29 when and T5 ( $2.99 \pm 0.69$  nM), and also in the comparison with T5NAC ( $2.65 \pm 0.77$   
30 nM). In soleus muscle, no difference in the comparison between C5 group ( $3.29 \pm 0.21$   
31 and T5 ( $3.46 \pm 0.34$  nM) was detected. All these data are presented in Figures 3C and  
32 D.

33 As a large part of the skeletal muscle is composed by membranes, in  
34 order to evaluate membranes oxidation/modification *tert*-butyl hydroperoxide-initiated

1 chemiluminescence was assayed with the main goal of analyze integrity of cell and  
2 organelle membranes. Resulting chemiluminescence curves are presented in figures 3E  
3 and F. EDL showed significant increase in T5 chemiluminescence curve when  
4 compared to C5, which was partially diminished in T5NAC ( $p < 0.0001$  for all  
5 comparisons). These results are in accordance with weight and crossed sectional area.  
6 On the other hand, soleus analysis showed no statistical difference when T5 curve was  
7 compared to C5. However, T5NAC produced the highest emission compared to C5 and  
8 T5, showing a time-course highly significant curve elevation during the entire analysis  
9 ( $p < 0.0001$ ).

### 11 **Electron microscopy analysis**

13                   Electron microscopy analysis in EDL and soleus control muscle  
14 revealed that myofibrils are surrounded by the junctional SR and longitudinal SR in A  
15 band and I band. The first noticeable change in the SR morphology is the prominent  
16 loss of this network in tumor implanted animal, although it seems that in T5NAC this  
17 morphological change is less expressive in the A band when compared to T5. The I  
18 band SR in the C5 visibly occupies two layers well aligned between myofibrils. T5 SR  
19 organization is constituted of a single irregular layer in different regions around  
20 myofibrils. This characteristic is less prominent in T5NAC compared to T5. The SR  
21 vesicles shape in SR tubules in T5 and T5NAC present smaller dilatation, both in EDL  
22 and soleus muscle fibers, when compared to control groups. All these events can be  
23 observed in representative micrographs of Figures 4 (EDL) and 5 (Soleus). This  
24 morphological SR changes could be traced quantitatively and number of occurrences  
25 determined (Fig. 6). The SR volume area decreased in T5 group, both in EDL muscle  
26 (18.89%,  $p < 0.005$ ) and soleus muscle (22.09%,  $p < 0.0001$ ) when compared to control  
27 group. In none of the evaluated muscles, the antioxidant treatment revealed some level  
28 of protection.

29                   As revealed by mitochondrial EM quantitative analysis, EDL skeletal  
30 fibers from T5 shows significantly reduced mitochondrial volume as demonstrated in  
31 table 2 (column A) and mitochondrial surface (column B) when compared to C5 group  
32 (22.41% and 16.11%, respectively). In support to these quantitative data, representative  
33 electron micrographs are presented on Figure 7 (A, C, E for EDL and B, D, F for  
34 soleus). In tumor group, mitochondria appears more rounded in I band (Fig. 7C, black

1 arrow) in comparison to elongated mitochondria in control group (Fig. 7A, black  
2 arrow). Yet, T5NAC exhibits an extensive mitochondrial network and larger  
3 mitochondria organelles (black arrow, fig. 7E) in the comparison between C5 and T5. In  
4 addition, mitochondria are more fragmented in T5 group, as supported by measurements  
5 of aspect ratio (AR) and form factor (FF) (Fig. 8). Treatment with NAC 1% was able to  
6 restore all these features, including mitochondrial network. However, the short-term  
7 tumour-induction and treatment with NAC 1% seemed to have a different effect in  
8 soleus muscle. Indeed no difference was showed in mitochondrial fibers volume and  
9 surface from soleus T5 when compared to C5. In contrast to EDL, treatment with NAC  
10 1% had the effect to reduce mitochondrial volume and surface (12.19% and 4.41%,  
11 respectively) when compared to control groups (table 3, columns A and B).

12

## 13 **DISCUSSION**

14

15 In the present study, the role of muscle wasting has been investigated  
16 during precachexia, in glycolytic and oxidative muscle of rats implanted with Walker-  
17 256 solid tumor, which induces the cachectic syndrome very quickly. In addition, we  
18 treated animals with a known antioxidant, N-acetylcysteine, to determine the  
19 involvement of oxidative stress on the early events of muscle mass induction.

20 The tumor implantation in T5 group already caused a lightly decrease  
21 in general body weight ( $-2.77 \pm 9.11\%$ ) when compared to control animals. This loss of  
22 body mass was accompanied by progressively decrease in food intake and core  
23 temperature during tumor development. Cancer cachexia has three very well defined  
24 stages of clinical relevance: precachexia, cachexia and refractory cachexia (FEARON et  
25 al., 2006). In precachexia, early clinical and metabolic signs (e.g. anorexia, altered  
26 temperature, and impaired glucose tolerance) can precede substantial involuntary weight  
27 loss ( $\leq 5\%$ ). In the present study, since weight loss demonstrated to be around 2%  
28 (mean), no consistent sarcopenia, strength and BMI loss was found, and parameters of  
29 anorexia and decreased metabolism could be observed, the stage of cancer cachexia was  
30 classified as precachexia, i.e. a previous stage to massive muscle catabolism without  
31 loss of adipose tissue.

32 In addition to moderate general body waste, a significant weight loss  
33 in EDL muscle (-15.33%) was found, contrasting with the small loss demonstrated by  
34 soleus (-5.14%) muscles. In rats, EDL is composed by more than 90% of type II fibers

1 (distributed between IIA, IIB and IIC), characterizing the muscle as prominently  
2 glycolytic metabolism. In soleus, the number of fiber type I varies between 87 and  
3 100% and fibers IIA 13 and 0% (NOVÁK et al., 2010). Thus, it seems that the first fiber  
4 type that suffer cachexia stimuli are the glycolytic, being EDL (or white muscles) a  
5 more sensitive muscle during all cancer cachexia development. These data corroborate  
6 previous findings that showed that different fiber types display a diverse susceptibility  
7 to atrophy, being atrophy stimuli-dependent (LI, et al. 2007). A fast-to-slow shift with  
8 preferential atrophy of fast glycolytic muscle fibers demonstrated to be induced by  
9 fasting (LI & GOLDBERG, 1976), glucocorticoid administration (GOLDBERG &  
10 GOODMAN, 1969), streptozotocin-induced diabetes (ARMSTRONG et al, 1975) or  
11 sepsis (TIAO et al., 1997). Similar changes were also observed in cancer cachexia  
12 (ACHARYYA et al., 2005). Additionally and curiously, Li et al. (2007) suggested in an  
13 experimental model of chronic heart failure, that oxidative phenotype renders myofibers  
14 resistant to pathological atrophic insults. Yet, it is important to notice that the partial  
15 prevention of all analyzed parameters by antioxidant treatment did not involve  
16 reductions of tumor size, demonstrating that oxidative stress has its action on muscle  
17 and not tumor cells.

18                   Among several factors, oxidative stress is a major player in the  
19 etiology of skeletal muscle dysfunction (FERMOSELLE et al., 2013). Oxidative attack  
20 to membranes, proteins and consumption of cytosolic antioxidants have been described  
21 in cancer-induced atrophy muscles (GUARNIER et al., 2010; MARIN CORRAL et al.,  
22 2010). However, a lot of attention has been paid on protein oxidation, and the  
23 conclusions have been based on very well established cachexia stages (massive body  
24 waste, muscle loss and catabolism). NAC is a glutathione precursor, an important  
25 antioxidant defense mechanism against oxidative stress (RUFFMANN & WENDEL,  
26 1991; TERRIL et al., 2011; MICHELUCCI et al., 2015). It provides sulfhydryl groups  
27 (SH) and scavenges reactive oxygen species as well (AGTEN et al., 2010). Several  
28 studies demonstrated that GSH, a known parameter of redox balance, is frequently  
29 diminished in skeletal muscle atrophy (GUARNIER et al., 2010; BERNARDES et al.,  
30 2014; MARINELLO et al., 2016). In the present study, while in EDL GSH remained at  
31 control levels both in T5 and also in T5 treated with NAC, soleus showed consumption  
32 of GSH levels in T5 and also T5NAC, which indicates that this muscle suffer some kind  
33 of redox cytosolic adaptation due to tumor presence. Curiously, no difference in the  
34 comparison between T5 and T5NAC GSH levels were found, indicating that NAC

1 treatment did not promote the expected increasing on water soluble antioxidant effects.  
2 When cytosolic oxidative stress is present, the expected phenomenon is the  
3 consumption of GSH with consequent increase of GSSG (HALLIWELL &  
4 GUTTERIDGE, 2007). However, no differences were detected on soleus GSSG levels,  
5 indicating that GSH could have been used in another pathway, such as protein  
6 glutathiolation (BACHI et al., 2013). An important result in this assay was that  
7 evaluated parameters corroborates that different fiber types display a diverse response at  
8 the same stimuli that leads to early stage muscle wasting.

9           Among oxidative events involved in muscle cancer cachexia, protein  
10 oxidation seems to be a critical one. During the past years, the different levels of protein  
11 oxidation have been pointed as the main responsible for the skeletal muscle atrophy in  
12 well-established cachexia (BARREIRO et al., 2005; MARIN-CORRAL et al., 2010;  
13 GUARNIER et al., 2010). In the present study, both EDL and soleus muscles presented  
14 no alterations in carbonyl groups content 5 days after tumor implantation. This data  
15 agreed with previous results from our group in gastrocnemius muscle (GUARNIER et  
16 al., 2010), that showed significant protein carbonylation in this muscle only after 10  
17 days of tumor implantation, reinforcing that protein oxidation is not an early event in  
18 muscle catabolism. Some studies have demonstrated that protein oxidation could be a  
19 consequence of membrane modifications through adducts formation between its end-  
20 products (e.g. 2-4-hydroxynonenal, malodialdehyde) and tissue proteins by means of  
21 oxidation (CASTRO et al., 2016). Thus, modifications to membranes are hypothesized  
22 to be an event preliminary to protein oxidation.

23           Tert-butyl hydroperoxide-initiated chemiluminescence was used to  
24 evaluate the levels of lipid hydroperoxides in muscles homogenate of animals  
25 inoculated with tumor cells. This is a highly sensitive assay that indicates that increased  
26 chemiluminescence is closely related to the oxidative stress previously demonstrated by  
27 the tissue and the consequence modification of lipid membranes (GONZALEZ-  
28 FLECHA et al., 1991). In this study it was evidenced a qualitative difference in all  
29 chemiluminescence curves, indicating alteration in cell membrane properties.  
30 Additionally, it was also observed that EDL and soleus presented distinct results when  
31 the comparison T5 x C5 was performed in both muscles. If on the one hand EDL  
32 muscles demonstrated around 40% of increased lipid peroxidation levels on T5 group  
33 when compared to control, on the other hand soleus showed no significant difference in  
34 the same comparison. NAC treatment protected from lipid peroxidation in EDL, but

1 worse photon emission in soleus. These results reinforce the fact that oxidative  
2 modifications (and also the type of chemical structure compromised) is different  
3 between predominantly glycolytic and oxidative muscles. Since in precachexia EDL is  
4 more sensitive to weight loss and atrophy (determined by cross-sectional area) than  
5 soleus, it is reasonable to assume that membrane oxidation is a modification that occurs  
6 previous to protein oxidation during cachexia development and that is also critical for  
7 massive cachexia that occurs afterwards. Recently, Antunes et al. (2014) identified in a  
8 chemical-induced animal model of bladder cancer cachexia that muscle mitochondria  
9 suffer from specific phospholipid dynamic modification that directly interfere in the  
10 organelle function and consequently production of reactive oxygen species. However,  
11 the experiments were performed in gastrocnemius muscle, and the 28 weeks model  
12 produced a very consistent cachexia (>10% of weight loss) at this time-point. In line of  
13 this, as SR and mitochondria (FRANZINI-ARMSTRONG, 1994) are the main  
14 constitutive organelles on the striated muscle, we decided to investigate in EM cuts,  
15 which organelle demonstrated lesser volume in precachexia at EDL and soleus muscles.

16 Abnormalities in muscle mitochondrial content, morphology and  
17 function have been reported in several muscle wasting conditions, including limb  
18 muscles of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) patients (GOSKER et al.  
19 2007; NAIMI et al. 2011; PUENTE-MAESTU et al. 2012), and diaphragm under  
20 mechanical ventilation (KAVAZIS et al. 2009). Mitochondrial dysfunction is a common  
21 event reported in cancer-related skeletal muscle wasting. At present, literature refers  
22 that skeletal muscle phenotype in cancer cachexia is characterized by a reduced number  
23 of mitochondria (WHITE et al., 2012; JULIENNE et al., 2012). The organelle was  
24 already suggested to be the place of energy wasting in cancer cachexia. However,  
25 although mitochondrial oxidative capacity has been detected on cachectic muscles, this  
26 fact does not seem to produce alteration in ATP production efficiency (JULIENNE et  
27 al., 2012). In addition, every conclusion about mitochondria in atrophy-related cachexia  
28 is based on well-established cachexia (JULIENNE et al., 2012; TZIKA et al., 2013),  
29 what avoid inferences about which is the critical phenomenon that develops  
30 mitochondrial injury. Here, in tumor group we found significant reduced mitochondrial  
31 volume and surface in EDL, which was coincident to the muscle loss, crossed sectional  
32 area and lipid peroxidation. The treatment with a water soluble antioxidant was able to  
33 completely protect the waste observed in these values (but not muscle weight and cross  
34 sectional area). In contrast, in soleus, no mitochondrial content changes were found,

1 followed by a lightly and non-significant weight loss. These findings corroborate  
2 literature findings that EDL is a more sensitive and soleus more resistant to muscle  
3 waste in cancer cachexia, and also the fact that mitochondria is related in some way in  
4 the mechanism. The novelty in this study is that mitochondria volume and surface are  
5 completely restored by NAC treatment in the muscle that is sensitive, directly  
6 interfering in the muscle wasting.

7                   In line with this, in the last years, mitochondrial biogenesis and  
8 fragmentation have been pointed as one the main responsible by degradation on striated  
9 muscle (ROMANELLO & SANDRI, 2013; ROMANELLO & SANDRI, 2016). The  
10 changes of mitochondrial network influence the production of reactive oxygen species  
11 that play important roles on muscle function and also on degradation pathways  
12 (ROMANELLO AND SANDRI, 2016). Probably, the most efficient treatment would be  
13 able to interfere directly on optimizing mitochondrial function that is directly correlated  
14 with its fusion and fission (ROMANELLO & SANDRI, 2013). Mitochondrial dynamics  
15 (or plasticity) is defined by the capacity of the organelle to rapidly change its size, shape  
16 and distribution by continuously alternating fusion and fission events. Fusion leads to  
17 elongated mitochondria with increased interconnectivity into a tubular network. On the  
18 contrary, fission fragments the network into unconnected shorter organelles. Increased  
19 mitochondrial fusion facilitates the redistribution of metabolites, proteins and mtDNA  
20 within the network (ROMANELLO & SANDRI, 2016). Moreover, fusion between  
21 healthy and damaged organelles allows to dilute the damaged material into the healthy  
22 network, avoiding the accumulation of dysfunctional mitochondria and maintain their  
23 overall fitness (function) (TWIG et al., 2008). On the other hand, mitochondrial  
24 fragmentation is a mechanism that segregates dysfunctional or damaged components of  
25 the mitochondrial network, allowing their removal via mitophagy (OTERA &  
26 MIHARA, 2011). In the present study, mitochondrial network was evaluated only in  
27 EDL muscles, since no differences were detected on soleus. Aspect ratio (AR) was the  
28 parameter related to fission, whereas form factor (FF) was the parameter related to  
29 fusion (AINBINDER et al., 2015). As observed in micrographs and also in quantitative  
30 analysis, T5 produced in EDL a huge amount of fusion (redistribution of mitochondria  
31 for energy optimizing and functional maintenance), whereas NAC treatment, produced a  
32 great amount of fission (removal of damaged mitochondria via mitophagy). These  
33 results indicate that, although NAC does not alter intracellular GSH levels, its  
34 mechanism of action interferes directly on mitochondrial dynamics, optimizing energy

1 and avoiding excessive ROS production. Chemiluminescence results reinforce these  
2 conclusions, since lipid peroxidation is also reduced under NAC treatment, and  
3 decreased area and surface of mitochondria were found in soleus treated with NAC.

4                   It is known that mitochondria and SR possess a structural association  
5 that provides an optimal bidirectional SR-mitochondrial communication (ROSSI, et al.  
6 2009). Different types of molecular mechanisms contribute to energy expenditure and,  
7 therefore, involuntary body weight loss; among them, adenosine triphosphate (ATP)  
8 consumption by sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  pumps (SERCA) could represent a key  
9 mechanism. The amount of SERCA is dependent from the amount of SR membranes on  
10 the muscle (ARGILÉS et al., 2014). The decreased amount of SR volume found in EDL  
11 and soleus of tumor-bearing animals, when soleus muscle still did not develop weight  
12 loss, lead us to the SR would be the organelle that go off the initial events to muscle  
13 weakness and atrophy (before or on a different pathway but mitochondria). Decreased  
14 SR volume could be an easy indicative that oxidative muscles are more prompt to adapt  
15 to energy demands without mitochondrial disturbance, decreasing the risk of atrophy,  
16 by means of decreasing SERCA units. This can suggest that targeting SR dysfunction  
17 might be a new promising area of research to prevent or limit muscle wasting, since  
18 targeting mitochondria on oxidative muscles worse organelle quality. NAC may act as  
19 a direct antioxidant in skeletal muscle fibers by protecting specific cellular sites from  
20 oxidative damage in several models (FERMOSELLE et al., 2013). Yet, it has already  
21 been demonstrated that NAC also has the potential to act as a pro-oxidant when there is  
22 no need of scavenge antioxidants (OIKAWA et al., 1999). In this study, we found that  
23 NAC promotes diverse effects on cellular structure of the two different fiber types  
24 analyzed.

25                   In conclusion, in precachexia, where body mass waste is still not very  
26 well established, EDL is already sensitive to muscle waste, lipid peroxidation and  
27 mitochondrial and SR dynamics alterations. When mitochondria is the treatment target,  
28 a glycolytic muscle can be recovered, but some worse is observed on oxidative muscles.  
29 On the other hand, when there is no muscle waste, oxidative muscle already  
30 demonstrates SR adaptation, indicating that this organelle could be the responsible for  
31 energy adaptation and resistance. These findings suggest that targeting SR dysfunction  
32 might be an area of research to prevent or limit muscle wasting.

## 1 REFERENCES

- 2 Acharyya S, Ladner KJ, Nelsen LL, Damrauer J, Reiser PJ, Swoap S, Guttridge DC.  
3 Cancer cachexia is regulated by selective targeting of skeletal muscle gene products.  
4 2004; 114: 370-8.
- 5 Acharyya S, Butchbach ME, Sahenk Z, Wang H, Saji M, Carathers M, Ringel MD,  
6 Skipworth RJ, Fearon KC, Hollingsworth MA, Muscarella P, Burghes AH, Rafael-  
7 Fortney JA, Guttridge DC. Dystrophin glycoprotein complex dysfunction: a regulatory  
8 link between muscular dystrophy and cancer cachexia. *Cancer Cell*. 2005; 8: 421-32.
- 9 Agten A, Maes K, Smuder A, Powers SK, Decramer M, Gayan-Ramirez G. N-  
10 acetylcysteine attenuates ventilator-induced diaphragm dysfunction in rats. *Crit Care*.  
11 2010; 14: 203.
- 12 Ainbinder A, Boncompagni S, Protasi F, Dirksen RT. Role of Mitofusin-2 in  
13 mitochondrial localization and calcium uptake in skeletal muscle. *Cell Calcium*. 2015;  
14 57: 14-24.
- 15 Argilés JM, Fontes-Oliveira CC, Toledo M, López-Soriano FJ, Busquets S. Cachexia: a  
16 problem of energetic inefficiency. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2014; 5: 279–86.
- 17 Armstrong RB, Gollnick PD, Ianuzzo CD. Histochemical properties of skeletal muscle  
18 fibers in streptozotocin-diabetic rats. *Cell Tissue Res*. 1975; 162: 387-94.
- 19 Antunes D, Padrão AI, Maciel E, Santinha D, Oliveira P, Vitorino R, Moreira-  
20 Gonçalves D, Colaço B, Pires MJ, Nunes C, Santos LL, Amado F, Duarte JA,  
21 Domingues MR, Ferreira R. Molecular insights into mitochondrial dysfunction in  
22 cancer-related muscle wasting. *Biochim Biophys Acta*. 2014; 1841: 896-905.
- 23 Bachi A, Dalle-Donne I, Scaloni A. Redox Proteomics: Chemical Principles,  
24 Methodological Approaches and Biological/Biomedical Promises. *Chem Rev*. 2013;  
25 113: 596–698.
- 26 Baracos VE, DeVivo C, Hoyle DH, Goldberg AL. Activation of the ATP-ubiquitin-  
27 proteasome pathway in skeletal muscle of cachectic rats bearing a hepatoma. *Am J*  
28 *Physiol*. 1995; 268: 996-1006.

- 1 Baracos VE. Pitfalls in defining and quantifying cachexia. *J Cachexia Sarcopenia*  
2 *Muscle*. 2011; 2: 71-3.
- 3 Barreiro E, de la Puente B, Busquets S, López-Soriano FJ, Gea J, Argilés JM. Both  
4 oxidative and nitrosative stress are associated with muscle wasting in tumour-bearing  
5 rats. *FEBS Lett*. 2005; 579: 1646-52.
- 6 Bernardes SS, Guarnier FA, Marinello PC, Armani A, Simão AN, Cecchini R, Cecchini  
7 AL. Reactive oxygen species play a role in muscle wasting during thyrotoxicosis. *Cell*  
8 *Tissue Res*. 2014; 357: 803-14.
- 9 Boncompagni S, Rossi AE, Micaroni M, Hamilton SL, Dirksen RT, Franzini-Armstrong  
10 C, Protasi F. Characterization and temporal development of cores in a mouse model of  
11 malignant hyperthermia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 (a); 106: 21996-2001.
- 12 Boncompagni S, Rossi AE, Micaroni M, Beznoussenko GV, Polishchuk RS, Dirksen  
13 RT, Protasi F. Mitochondria are linked to calcium stores in striated muscle by  
14 developmentally regulated tethering structures. *Mol Biol Cell*. 2009 (b); 20: 1058-67.
- 15 Brookes PS, Yoon Y, Robotham JL, Anders MW, Sheu SS. Calcium, ATP, and ROS: a  
16 mitochondrial love-hate triangle. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2004; 287: 17-33.
- 17 Carson JA, Hardee JP, VanderVeen BN. The emerging role of skeletal muscle oxidative  
18 metabolism as a biological target and cellular regulator of cancer-induced muscle  
19 wasting. *Semin Cell Dev Biol*. 2016; 54: 53-67.
- 20 Castro JP, Jung T, Grune T, Siems W. 4-Hydroxynonenal (HNE) modified proteins in  
21 metabolic diseases. *Free Radic Biol Med*. 2016.
- 22 Constantinou C, Fontes de Oliveira CC, Mintzopoulos D, Busquets S, He J, Kesarwani  
23 M, Mindrinos M, Rahme LG, Argilés JM, Tzika AA. Nuclear magnetic resonance in  
24 conjunction with functional genomics suggests mitochondrial dysfunction in a murine  
25 model of cancer cachexia. *Int J Mol Med*. 2011; 27: 15–24.
- 26 Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Gagliano N, Lusini L, Milzani A, Di Simplicio P,  
27 Colombo R. Actin carbonylation: from a simple marker of protein oxidation to relevant  
28 signs of severe functional impairment. *Free Radic Biol Med*. 2001; 31: 1075–83.

- 1 Dalle-Donne I, Giustarini D, Colombo R, Rossi R, Milzani A. Protein carbonylation in  
2 human diseases. *Trends Mol Med.* 2003; 9:169-76.
- 3 Deneke SM, Fanburg BL. Regulation of cellular glutathione. *Am j physiol.* 1989; 257:  
4 163-73.
- 5 Dirksen RT. Sarcoplasmic reticulum–mitochondrial through-space coupling in skeletal  
6 muscle. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2009; 34: 389–95.
- 7 Fearon KCH, Voss AC, Hustead DS, on behalf of the Cancer Cachexia Study Group.  
8 Definition of cancer cachexia: effect of weight loss, reduced food intake and systemic  
9 inflammation on functional status and prognosis. *Am J Clin Nutr.* 2006; 83: 1345–50.
- 10 Fermoselle C, García-Arumí E, Puig-Vilanova E, Andreu AL, Urtreger AJ, de Kier  
11 Joffé ED, Tejedor A, Puente-Maestu L, Barreiro E. Mitochondrial dysfunction and  
12 therapeutic approaches in respiratory and limb muscles of cancer cachectic mice. *Exp*  
13 *Physiol.* 2013; 98: 1349-65.
- 14 Fontes-Oliveira CC, Busquets S, Toledo M, Penna F, Aylwin MP, Sirisi S, Silva AP,  
15 Orpi M, García A, Sette A, Genovese MI, Oliván M, López-Soriano FJ & Argilés JM.  
16 Mitochondrial and sarcoplasmic reticulum abnormalities in cancer cachexia: altered  
17 energetic efficiency? *Biochim Biophys Acta.* 2012; 1830: 2770–8.
- 18 Franzini-Armstrong C. The sarcoplasmic reticulum and the transverse tubules. In: Engel  
19 AE, Frazini-Armstrong C, editors. *Myology.* New York: McGraw-Hill; 1994: 176-99.
- 20 Goldberg AL, Goodman HM. Relationship between cortisone and muscle work in  
21 determining muscle size. *J Physiol.* 1969; 200: 667–75.
- 22 Gonzalez-Flecha B, Llesuy S, Boveris A. Hydroperoxide initiated chemiluminescence:  
23 an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver and muscle. *Free Rad Biol Med.*  
24 1991; 10: 93-100.
- 25 Gosker HR, Hesselink MK, Duimel H, Ward KA & Schols AM. Reduced mitochondrial  
26 density in the vastus lateralismuscle of patients with COPD. *Eur Respir J.* 2007; 30: 73–  
27 9.

- 1 Halliwell, B, Gutteridge, JMC. Free Radicals in Biology and Medicine. 4. ed. Oxford:  
2 Oxford University Press, 2007.
- 3 Höhn A, König J, Grune T. Protein oxidation in aging and the removal of oxidized  
4 proteins. *Journal of proteomics*. 2013; 92: 132-59.
- 5 Höhn A, Weber D, Jung T, Ott C, Hugo M, Kochlik B, Kehm R, König J, Grune T,  
6 Castro JP. Happily (n)ever after: Aging in the context of oxidative stress, proteostasis  
7 loss and cellular senescence. *Redox Biol*. 2016; 11: 482-501.
- 8 Julienne CM, Dumas JF, Goupille C, Pinault M, Berri C, Collin A, Tesseraud S, Couet  
9 C, Servais S. Cancer cachexia is associated with a decrease in skeletal muscle  
10 mitochondrial oxidative capacities without alteration of ATP production efficiency. *J*  
11 *Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2012; 3: 265–75.
- 12 Jürgens KD. Etruscan shrew muscle: the consequences of being small. *J Exp Biol*.  
13 2002; 205: 2161-6.
- 14 Kavazis AN, Talbert EE, Smuder AJ, Hudson MB, Nelson WB & Powers SK.  
15 Mechanical ventilation induces diaphragmatic mitochondrial dysfunction and increased  
16 oxidant production. *Free Radic Biol Med*. 2009; 46, 842–50.
- 17 Knollmann BC, Chopra N, Hlaing T, Akin B, Yang T, Etensohn K, Knollmann BE,  
18 Horton KD, Weissman NJ, Holinstat I, Zhang W, Roden DM, Jones LR, Franzini-  
19 Armstrong C, Pfeifer K. Casq2 deletion causes sarcoplasmic reticulum volume increase:  
20 premature Ca<sup>2+</sup> release, and catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia, *J*.  
21 *Clin. Invest*. 2006; 116. 2510–20.
- 22 Lecker SH, Goldberg AL, Mitch WE. Protein degradation by the ubiquitin-proteasome  
23 pathway in normal and disease states. *J Am Soc Nephrol*. 2006; 17: 1807–19.
- 24 Li JB, Goldberg AL. Effects of food deprivation on protein synthesis and degradation in  
25 rat skeletal muscles. *Am J Physiol*. 1976; 231: 441-8.
- 26 Li P, Waters RE, Redfern SI, Zhang M, Mao L, Annex BH, Yan Z. Oxidative  
27 phenotype protects myofibers from pathological insults induced by chronic heart failure  
28 in mice. *Am J Pathol*. 2007; 170: 599-608.

- 1 Marin-Corral J, Fontes CC, Pascual-Guardia S, Sanchez F, Oliván M, Argilés JM,  
2 Busquets S, López-Soriano FJ, Barreiro E. Redox balance and carbonylated proteins in  
3 limb and heart muscles of cachectic rats. *Antioxid Redox Signal*. 2010; 12: 365-80.
- 4 Marinello PC, Bernardes SS, Guarnier FA, da Silva TN, Borges FH, Lopes NM, Simão  
5 AN, Armani A, Cecchini R, Cecchini AL. Isoflavin-beta modifies muscle oxidative  
6 stress and prevents a thyrotoxicosis-induced loss of muscle mass in rats. *Muscle  
7 Nerve*. 2016. doi: 10.1002/mus.25546.
- 8 Meyer OA, Tilson HA, Byrd WC, Riley MT. A method for the routine assessment of  
9 fore- and hindlimb grip strength of rats and mice. *Neurobehav Toxicol*. 1979; 1: 233-6.
- 10 Michelucci A, Paolini C, Canato M, Wei-Lapierre L, Pietrangelo L, De Marco A,  
11 Reggiani C, Dirksen RT, Protasi F. Antioxidants protect calsequestrin-1 knockout mice  
12 from halothane- and heat-induced sudden death. *Anesthesiology*. 2015; 123: 603–17.
- 13 Mishra P, Chan DC. Metabolic regulation of mitochondrial dynamics. *J. Cell Biol*.  
14 2016; 212: 379–87.
- 15 Mobley BA, Eisenberg BR. Sizes of Components in Frog Skeletal Muscle Measured by  
16 Methods of Stereology. *J Gen Physiol*. 1975; 66: 31-45.
- 17 Naimi AI, Bourbeau J, Perrault H, Baril J, Wright-Paradis C, Rossi A, Taivassalo T,  
18 Sheel AW, Rabol R, Dela F & BoushelR. Altered mitochondrial regulation in  
19 quadriceps muscles of patients with COPD. *Clin Physiol Funct Imaging*. 2011; 31: 124–  
20 31.
- 21 Novák P, Zachařová G, Soukup T. Individual, Age and Sex Differences in Fiber Type  
22 Composition of slow and fast muscles of adult Lewis rats: comparison with other rat  
23 strains. *Physiol. Res*. 2010; 59: 783-801.
- 24 Oikawa S, Yamada K, Yamashita N, Tada-Oikawa S, Kawanishi S. N-acetylcysteine, a  
25 cancer chemopreventive agent, causes oxidative damage to cellular and isolated DNA.  
26 *Carcinogenesis*. 1999; 20: 1485–90.
- 27 Otera H, Mihara K. Molecular mechanisms and physiologic functions of mitochondrial  
28 dynamics. *J. Biochem*. 2011; 149: 241–51.

- 1 Puente-Maestu L, Tejedor A, Lázaro A, de Miguel MJ, Alvarez-Sala L, González-  
2 Aragonés F, Simón C & Agustína. Site of mitochondrial reactive oxygen species  
3 production in skeletal muscle of chronic obstructive pulmonary disease and its  
4 relationship with exercise oxidative stress. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2012; 47: 358–  
5 62.
- 6 Romanello V, Sandri M. Mitochondrial biogenesis and fragmentation as regulators of  
7 protein degradation in striated muscles. *J Mol Cell Cardiol.* 2013; 55: 64-72.
- 8 Romanello V, Sandri M. Mitochondrial quality control and muscle mass maintenance.  
9 *Front Physiol.* 2016; 6: 422.
- 10 Rossi AE, Boncompagni S, Dirksen RT. Sarcoplasmic reticulum-mitochondrial  
11 symbiosis: bidirectional signaling in skeletal muscle. *Exerc Sport Sci Rev.* 2009; 37:  
12 29-35.
- 13 Ruffmann R, Wendel A. GSH rescue by N-acetylcysteine. *Clinical pharmacology.*  
14 1991; 69: 857-62.
- 15 Sandri M. Signaling in Muscle Atrophy and Hypertrophy. *Physiology.* 2008; 23: 160-  
16 70.
- 17 Sarhill N, Mahmoud FA, Christie R, Tahir A. Assessment of nutritional status and fluid  
18 deficits in advanced cancer. *Am J Hosp Palliat Care.* 2003; 20: 465-73.
- 19 Senft D, Ronai ZA. Regulators of mitochondrial dynamics in cancer. *Curr. Opin. Cell*  
20 *Biol.* 2016; 39: 43–52.
- 21 Squecco R, Carraro U, Kern H, Pond A, Adami N, Biral D, Vindigni V, Boncompagni  
22 S, Pietrangelo T, Bosco G, Fanò G, Marini M, Abruzzo PM, Germinario E, Danieli-  
23 Betto D, Protasi F, Francini F, Zampieri S. A subpopulation of rat muscle fibers  
24 maintains an assessable excitation-contraction coupling mechanism after long-standing  
25 denervation despite lost contractility. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2009; 68. 1256-68.
- 26 Terrill JR, Radley-Crabb HG, Grounds MD, Arthur PG. N-Acetylcysteine treatment of  
27 dystrophic mdx mice results in protein thiol modifications and inhibition of exercise  
28 induced myofibre necrosis. *Neuromuscular disorders.* 2011; 22: 427-34.

- 1 Tiao G, Lieberman M, Fischer JE, Hasselgren PO. Intracellular regulation of protein  
2 degradation during sepsis is different in fast- and slow-twitch muscle. *Am J Physiol.*  
3 1997; 272: 849-56.
- 4 Tietze, F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total  
5 and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal*  
6 *Biochem.* 1969; 27: 502-22.
- 7 Tisdale MJ. Mechanisms of cancer cachexia. *Physiol Rev.* 2009; 89: 381-410.
- 8 Tisdale MJ. Reversing cachexia. *Cell.* 2010; 142; 511-2.
- 9 Twig G, Elorza A, Molina AJ, Mohamed H, Wikstrom JD, Walzer G, Stiles L, Haigh  
10 SE, Katz S, Las G, Alroy J, Wu M, Py BF, Yuan J, Deeney JT, Corkey BE, Shirihai OS.  
11 Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by  
12 autophagy. *EMBO J.* 2008; 27: 433-46.
- 13 Tzika AA, Fontes-Oliveira CC, Shestov AA, Constantinou C, Psychogios N, RIGHI V,  
14 Mintzopoulos D, Busquets S, Lopez-soriano FJ, Milot S, Lepine F, Mindrinos MN,  
15 RAHME LG, Argiles JM. Skeletal muscle mitochondrial uncoupling in a murine cancer  
16 cachexia model. *Int J Oncol.* 2013; 43: 886-94.
- 17 White JP, Puppa MJ, Sato S, et al. Il-6 regulation on skeletal muscle mitochondrial  
18 remodeling during cancer cachexia in the *apcmin/+* mouse. *Skelet Muscle* 2012; 2:14.
- 19 Zhang H, Forman HJ, Choi J. Gamma-glutamyl transpeptidase in glutathione  
20 biosynthesis. *Methods Enzymol.* 2005; 401:468-83.

1 **Table 1:** Muscle, tumor and adipose tissue weights in tumor-induced cachexia.

<b>Analyzed Parameters</b>	<b>Groups</b>		
	<b>C5</b>	<b>T5</b>	<b>T5NAC</b>
<b>Weight gain (%)</b>	10.51 ± 2.78	-2.77 ± 9.11***	5.12 ± 5.91
<b>Gastrocnemius (mg)</b>	1116 ± 56.82	1001 ± 154.3	1089 ± 90.63
<b>EDL (mg)</b>	98.34 ± 6.7	83.26 ± 17.33 *	94.9 ± 9.210
<b>Soleus (mg)</b>	218 ± 20.25	199.2 ± 32.44	207.9 ± 22.96
<b>Adipose Tissue (g)</b>	1.21 ± 0.48	0.934 ± 0.25	1.06 ± 0.36
<b>Tumor size (g)</b>	—	4.62 ± 1.87	5.30 ± 2.14

2 Values are expressed as mean ± SD. (\*)  $P < 0.05$ , (\*\*\*)  $P < 0.001$  compared with C5. Positive values  
3 represent gain, and negative values decrease. —, no comparison.

1 **Table 2:** Quantitative analyses of EDL mitochondrial volume and surface in tumor-  
 2 induced cachexia.

	<b>A</b>	<b>B</b>
	<b>Mitochondrial volume/ total fiber volume, %</b>	<b>Mitochondrial surface/ fiber volume, <math>\mu\text{m}^{-1}</math></b>
<b>C5</b>	$5.8 \pm 0.5$ (110)	$18.0 \pm 0.5$ (149)
<b>T5</b>	$4.5 \pm 0.5^*$ (102)	$15.1 \pm 0.6^*$ (127)
<b>T5NA C</b>	$6.3 \pm 0.5^\#$ (133)	$20.6 \pm 1.6^\#$ (133)

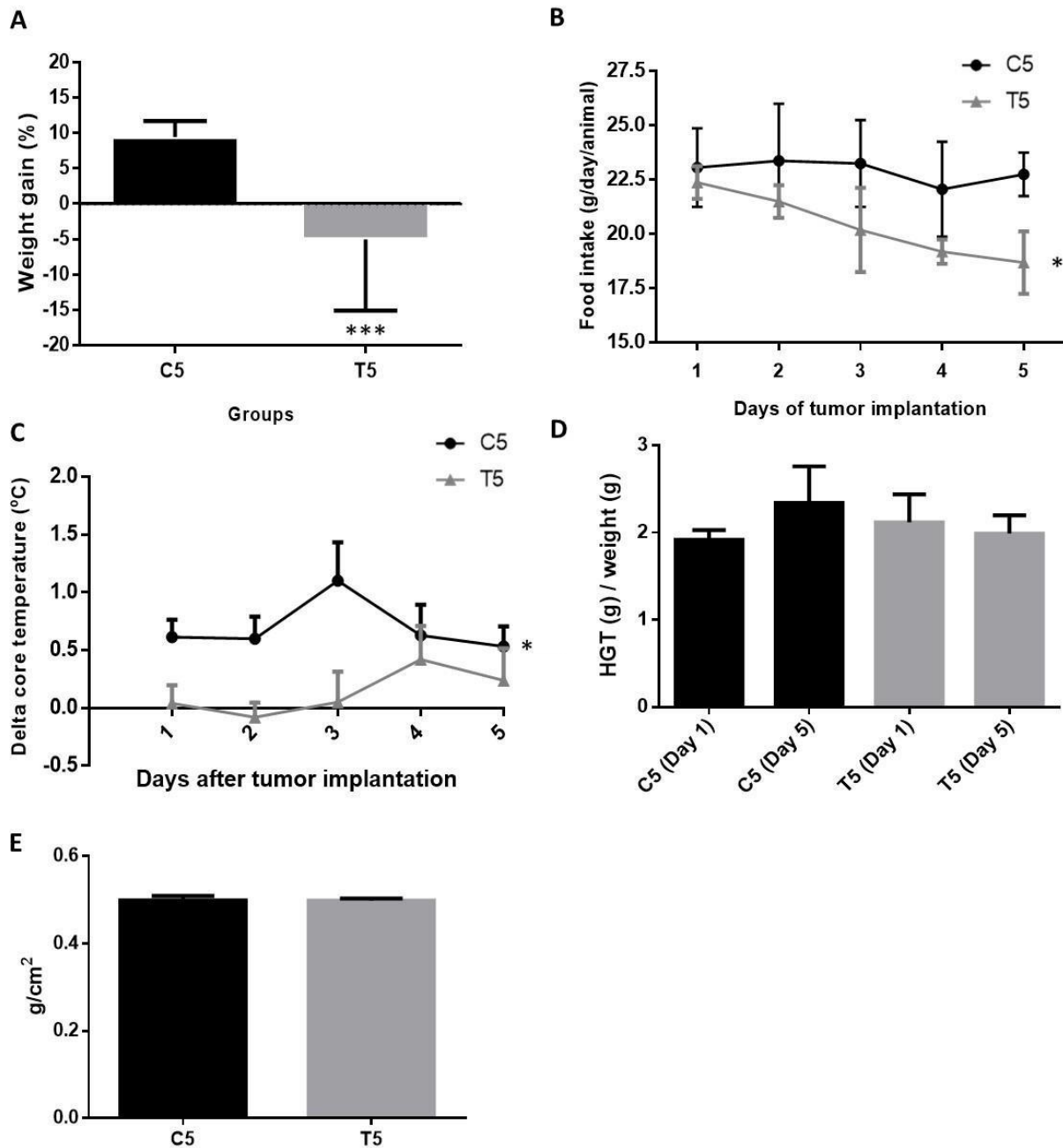
3 Quantitative analyze of EDL muscle mitochondria. (A) Mitochondria volume. (B) Mitochondria surface.  
 4 Values are expressed as mean  $\pm$  SE. (\*)  $P < 0.01$  compared with C5. (#)  $P < 0.01$  compared with T5.

5

6 **Table 3:** Quantitative analyses of soleus mitochondrial volume and surface in tumor-  
 7 induced cachexia.

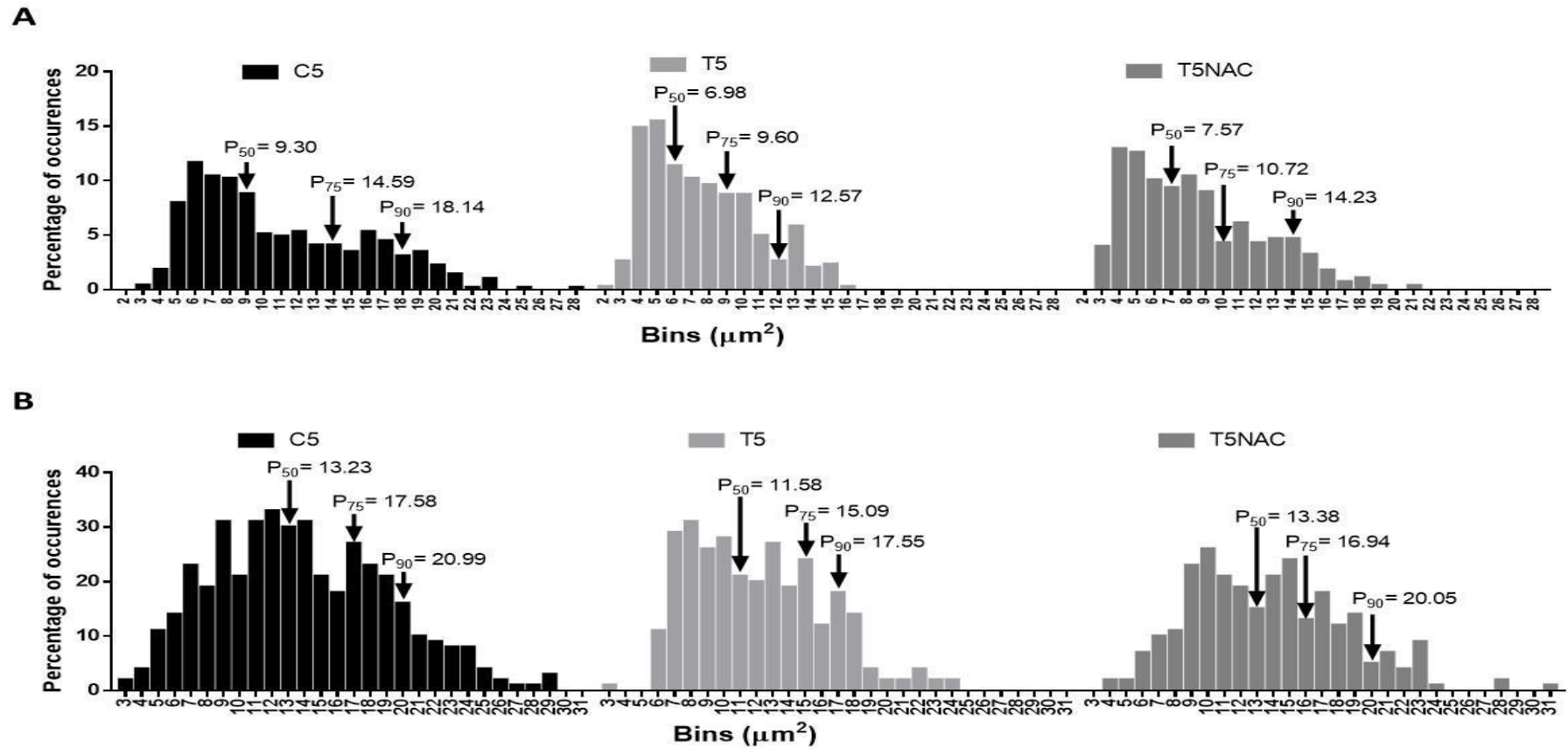
	<b>A</b>	<b>B</b>
	<b>Mitochondrial volume/ total fiber volume, %</b>	<b>Mitochondrial surface/ fiber volume, <math>\mu\text{m}^{-1}</math></b>
<b>C5</b>	$8.2 \pm 0.7$ (40)	$25.5 \pm 2.1$ (45)
<b>T5</b>	$8.0 \pm 0.6$ (58)	$25.3 \pm 2.0$ (74)
<b>T5NAC</b>	$7.2 \pm 0.9$ (44)	$24.4 \pm 3.3$ (44)

8 Quantitative analyze of soleus muscle mitochondria. (A) Mitochondria volume. (B) Mitochondria surface.  
 9 Values are expressed as mean  $\pm$  SE.

1 **Figure 1**

2 **Figure 1.** Characterization of physiological parameters in tumor-induced cachexia. (A) Weight gain (%)  
 3 after 5 days of tumor implantation. (B) Food intake. (C) Core temperature. (D) Hand grip strength test.  
 4 (E) Body-mass index. Values are expressed as mean  $\pm$  SD (column bar graph) or mean  $\pm$  SEM (points  
 5 graph). Positive values represent gain and negative values represent decrease. (\*)  $P < 0.05$  compared with  
 6 C5.

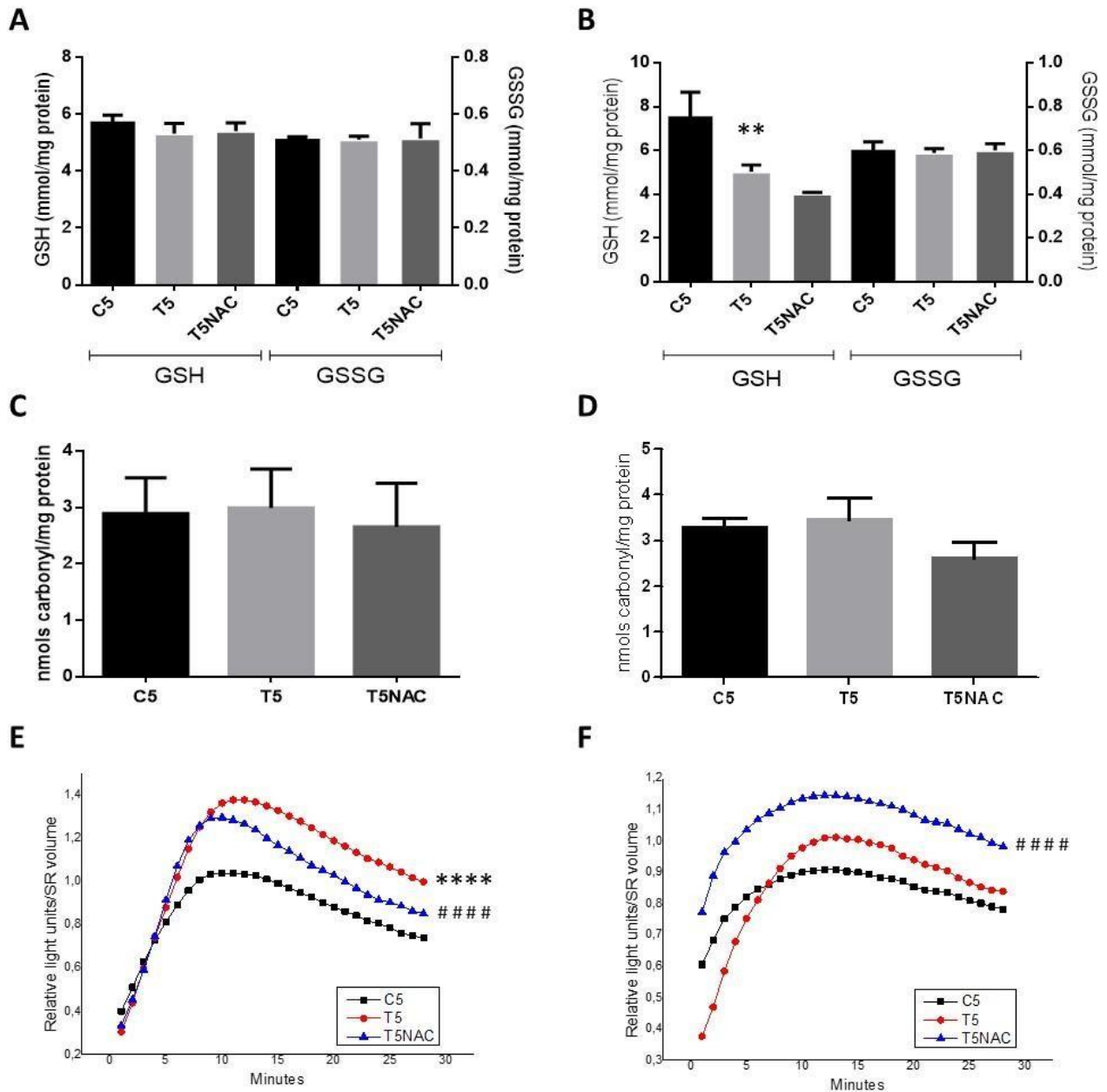
## 1 Figure 2



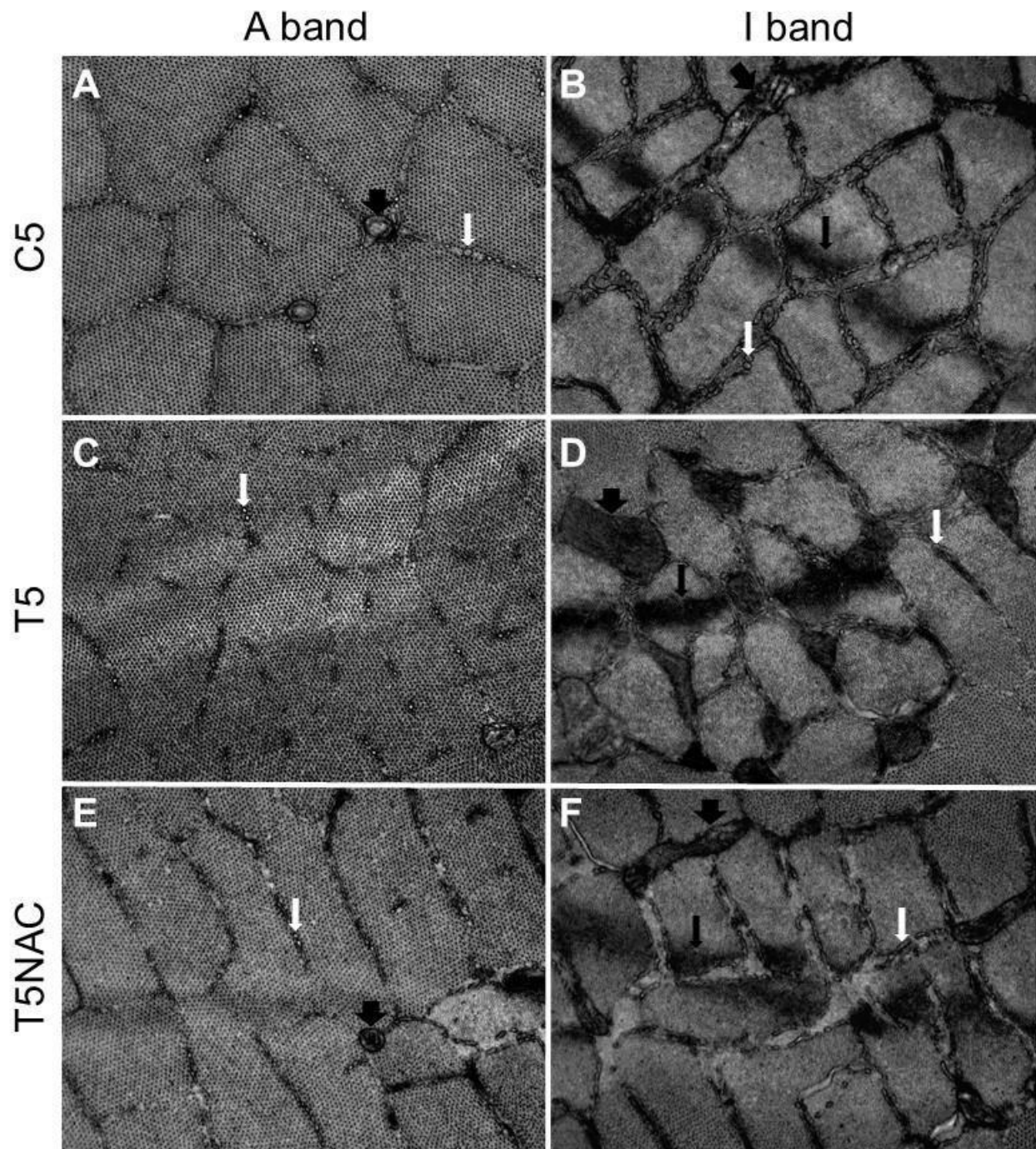
2

3 **Figure 2.** Histogram of frequency distribution of fiber cross-sectional areas ( $\mu\text{m}^2$ ). Muscles. (A) EDL muscle. (B) Soleus muscle. The values were grouped by procedure (C5,  
 4 T5 or T5NAC) and frequency distribution determined. Data are presented as 50<sup>th</sup>, 75<sup>th</sup> and 90<sup>th</sup> percentile (n=3). Original magnification 200X.

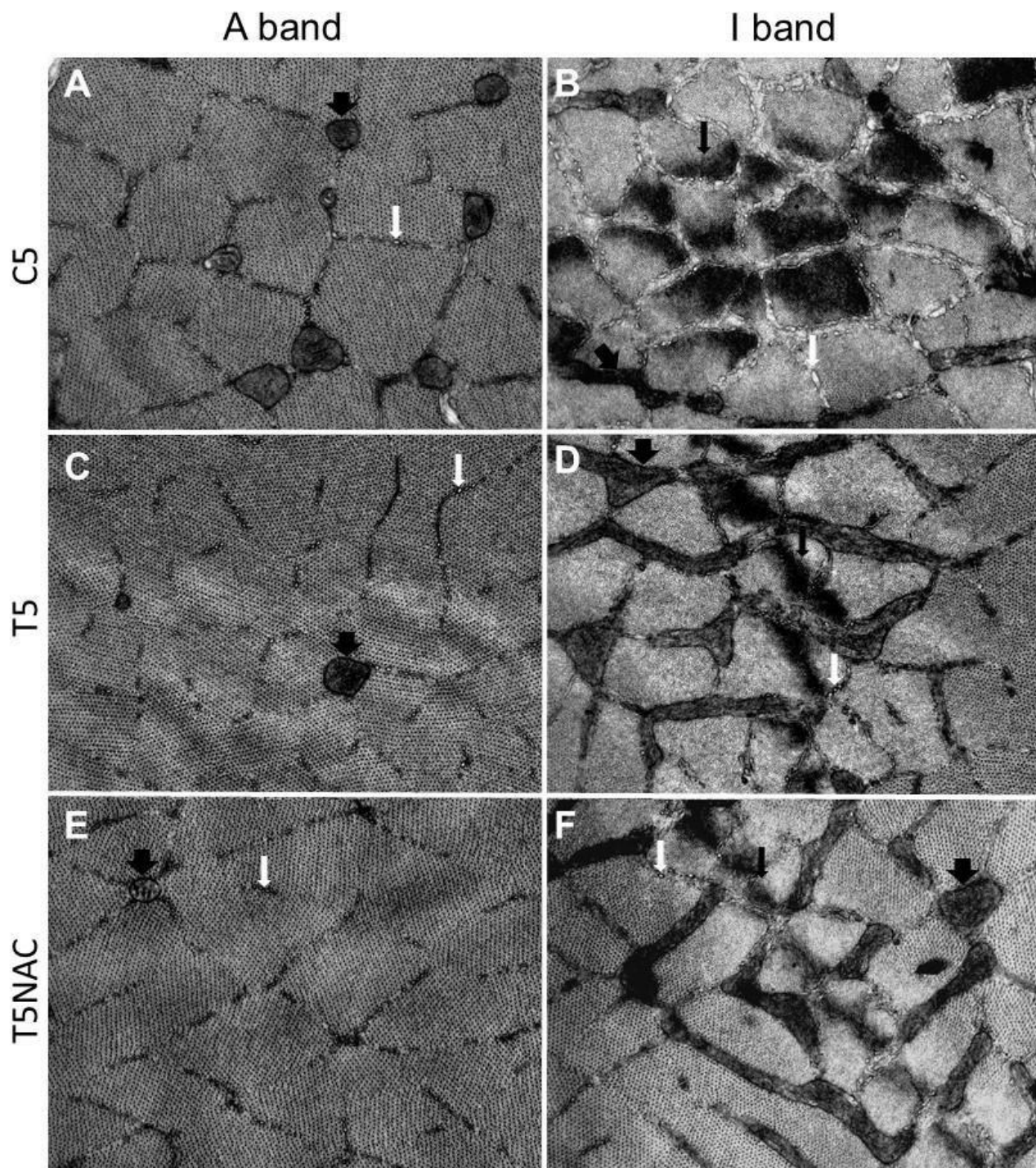
1 **Figure 3**  
2



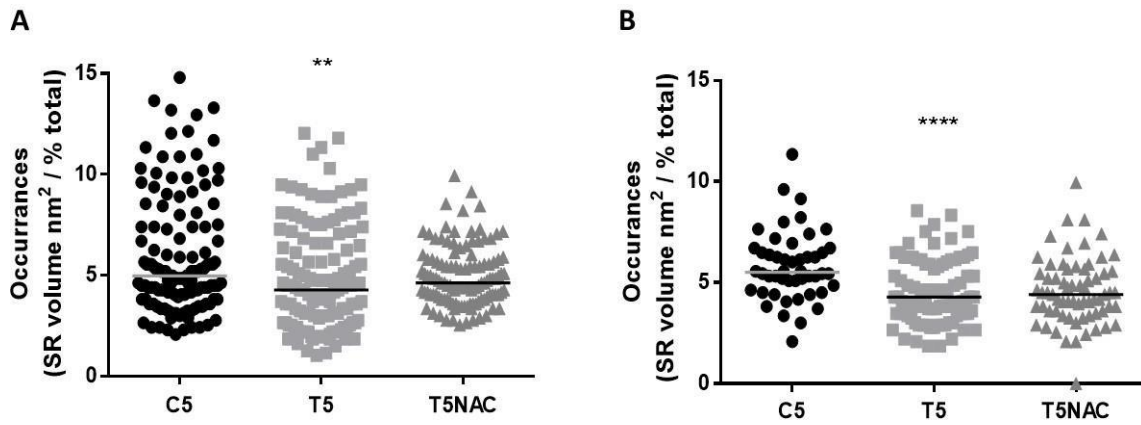
3 **Figure 3.** Oxidative stress parameters. Reduced glutathione and oxidized glutathione redox balance from EDL  
4 (A) and soleus (B). Levels of protein carbonylation from (C) EDL and (D) soleus. Levels of lipid hydroperoxides  
5 measured by chemiluminescence stimulated by tert-butyl hydroperoxide from EDL (E) and soleus (F). (\*\*)  
6  $P < 0.005$ , (\*\*\*\*)  $P < 0.0001$  compared with C5.  $P < 0.0001$  compared with T5.

1 **Figure 4**

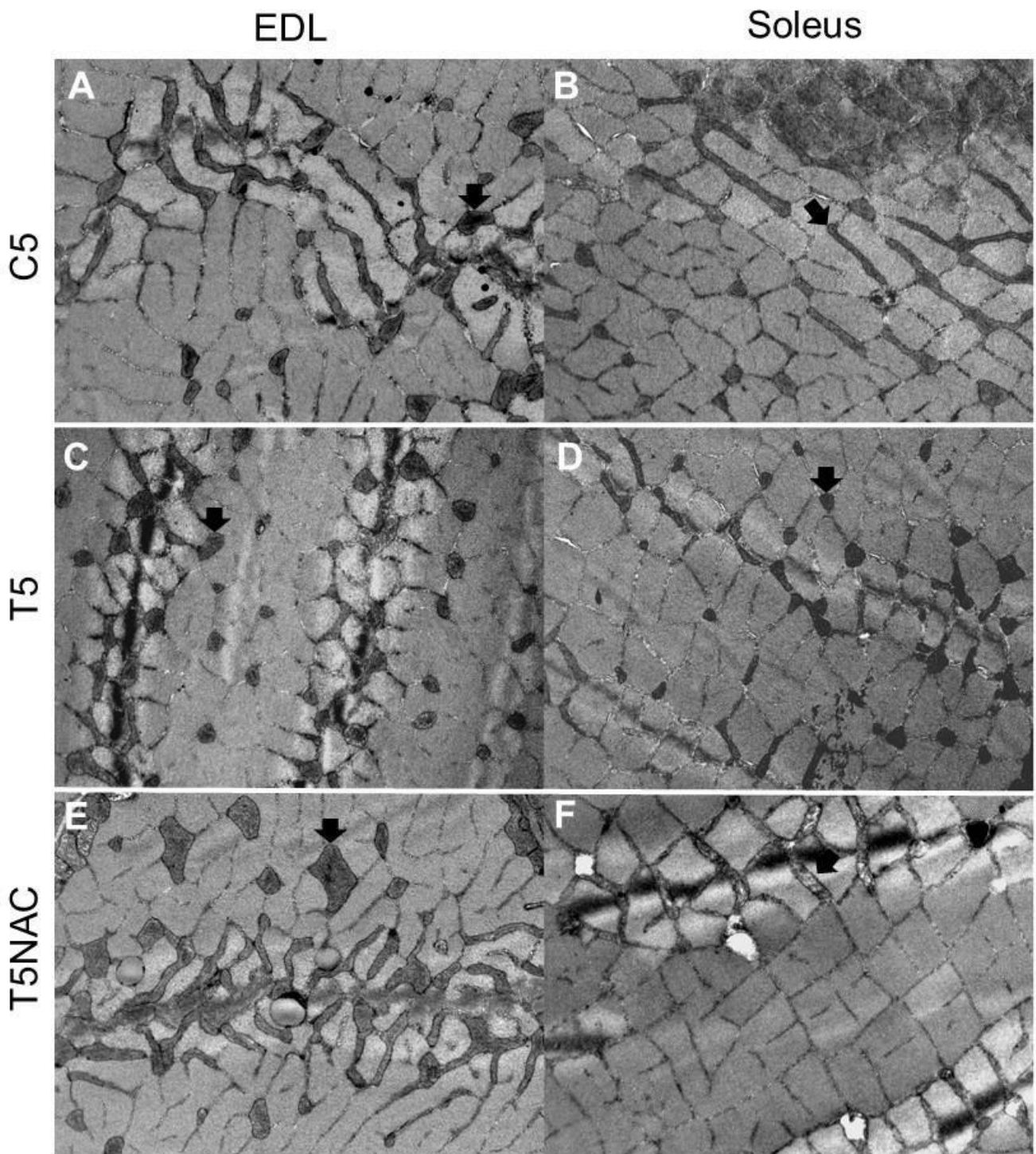
2 **Figure 4:** Representative electron micrographs of sarcoplasmic reticulum from EDL muscle. Black small arrow:  
 3 Z line in the I band; large black arrow: mitochondria; white arrow: sarcoplasmic reticulum. Original  
 4 magnification 8,900X.

1 **Figure 5**

2 **Figure 5:** Representative electron micrographs of sarcoplasmic reticulum from soleus muscle. Black  
 3 small arrow: Z line in the I band; large black arrow: mitochondria; white arrow: sarcoplasmic reticulum. Original  
 4 magnification 8,900X.

1 **Figure 6**

2 **Figure 6:** Quantitative analyze of sarcoplasmic reticulum volume (A) EDL muscle. (B) Soleus muscle. Values  
3 are represented as a scatter plot and median. (\*\*)  $P < 0.005$ , (\*\*\*\*)  $P < 0.0001$  compared with C5.

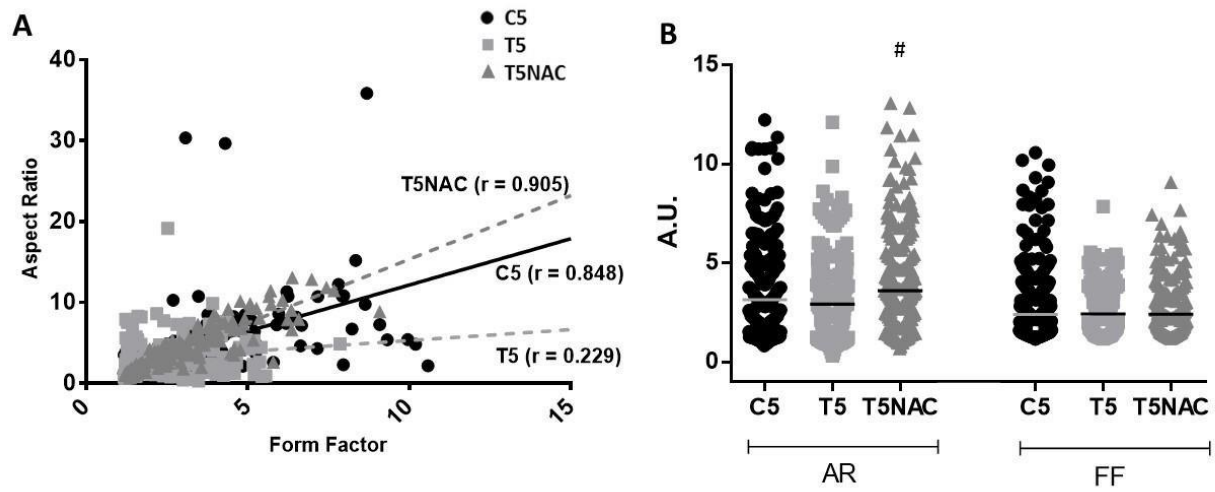
1 **Figure 7**

2 **Figure 7:** Representative electron micrographs of mitochondrial morphology from EDL and soleus muscle.

3 Mitochondria (black arrow) occupies A band and I band. Original magnification 7,100X.

1 **Figure 8**

2



3 **Figure 8:** Quantitative analyze of mitochondrial network in EDL muscle. (A) Measures of mitochondrial aspect ratio (AR)  
 4 and form factor (FF). (B) Average values of AR and FF. Values are represented as a scatter plot and median. (#)  $P < 0.05$   
 5 compared with T5.

## 1      **CONCLUSÃO**

2

3                      Em conclusão, durante o fase de pré-caquexia, a perda de massa  
4 muscular, a perda de massa muscular, acompanhada de alterações oxidativas e  
5 ultraestruturais ocorre primariamente em músculo com metabolismo  
6 predominantemente glicolítico, o EDL. Entretanto, adaptação de RS pode ser  
7 observadas no músculo sóleo, independentemente da ocorrência de perda de  
8 massa                      muscular                      ou                      alteração                      oxidativa.

## REFERÊNCIAS

- 1  
2
- 3 ARGILÉS, J. M. et al. Cancer cachexia: understanding the molecular basis. **Nat**  
4 **Rev Cancer**. v. 11, p. 754-762, 2014.
- 5 AUBIER, M.; VIRES, N. Calcium ATPase and respiratory muscle function. **Eur**  
6 **Respir J**. v. 11, p. 758-766. 1998.
- 7 BARREIRO, E. et al. N-acetylcysteine increases manganese superoxide dismutase  
8 activity in septic rat diaphragms. **Eur Respir J**. v. 26, p. 1032–1039, 2005.
- 9 BALON, T. W.; NADLER, J. L. Nitric oxide release is present from incubated skeletal  
10 muscle preparations. **J Appl Physiol**. v. 77, p. 2519– 2521, 1996.
- 11 BONETTO, A. et al. Are antioxidants useful for treating skeletal muscle atrophy?  
12 **Free Radic Biol Med**. v. 47, p. 906-916, 2009.
- 13 BONCOMPAGNI, S. et al. Mitochondria are linked to calcium stores in striated  
14 muscle by developmentally regulated tethering structures. **Mol Biol Cell**. v. 20, p.  
15 1058-1067, 2009.
- 16 BOZZETI, F.; SCRINIO WORKING GROUP. Screening the nutritional status in  
17 oncology: a preliminary report on 1,000 outpatients. **Support Care Cancer**. v. 17, p.  
18 279-284, 2009.
- 19 CAO, P. R.; KIM, H. J.; LECKER, S. H. Ubiquitin-protein ligases in muscle wasting.  
20 **Int J Biochem Cell Biol**. v. 37, p. 2088-2097, 2005.

- 1 Consenso brasileiro de caquexia/anorexia em cuidados paliativos. **Revista**  
2 **Brasileira de Cuidados Paliativos**. Suplemento 1. v. 3, p. 3-42, 2011.
- 3 COSTELLI, P.; BACCINO, F. M. Mechanisms of skeletal muscle depletion in wasting  
4 syndrome: role of ATP-ubiquitin-dependent proteolysis. **Curr Opin Clin Nutr Metab**  
5 **Care**. v. 6, p. 407-412, 2003.
- 6 COSTELLI, P. et al; Ca<sup>2+</sup> -dependent proteolysis in muscle wasting. **Int J Biochem**  
7 **Cell Biol**. v. 37, p. 2134-2146, 2005.
- 8 COTGREAVE, I. A. et al. Differentiation-specific alterations to glutathione synthesis  
9 in and hormonally stimulated release from human skeletal muscle cells. **Faseb J**. v.  
10 16, p. 435-437, 2002.
- 11 DALLE-DONNE, I. et al. Actin carbonylation: from a simple marker of protein  
12 oxidation revelant signs of severe functional impairment. **Free Radic Biol Med**. v. 31,  
13 n. 9, p. 1075-1083, 2001.
- 14 DAMIANI, E.; VOLPE, P.; MARGRETH, A. Coexpression of two isoforms of  
15 calsequestrin in rabbit slow-twitch muscle. **J Muscle Res Cell Motil**. v. 11, p. 522–  
16 530, 1990.
- 17 DIRKSEN, R. T. Sarcoplasmic reticulum-mitochondrial “through-space” coupling in  
18 skeletal muscle. **Appl Physiol Nutr Metab**. v. 34, p. 389-395, 2009.
- 19 DONOHOE, C. L.; RYAN, A. M.; REYNOLDS, J. V. Cancer cachexia: mechanisms  
20 and clinical implications. **Gastroenterol Res Pract**. 2011.

- 1 DOWLING, J. J. Oxidative stress and successful antioxidant treatment in models of  
2 RYR1-related myopathy. **Brain**, v. 135, p. 2115-2127, 2012.
- 3 DU, J.; et al. Activation of caspase-3 is an initial step triggering accelerated muscle  
4 proteolysis in catabolic conditions. **J Clin Invest**. v. 113, p. 115–123, 2004.
- 5 DUCHEN, M. R. Mitochondria and calcium: from cell signalling to cell death. **J**  
6 **Physiol**. v. 529 (Pt 1), p. 57–68, 2000.
- 7 ENDO, M. Calcium ion as a second messenger with special reference to excitation-  
8 contraction coupling. **J Pharmacol Sci**. v. 100, p. 519–524, 2006.
- 9 FEARON, K.; et al. Definition and classification of cancer cachexia: an international  
10 consensus. **Lancet Oncol**. v. 12, p. 489-495, 2011.
- 11 FERMOSELLE, C. et al. Mitochondrial dysfunction and therapeutic approaches in  
12 respiratory and limb muscles of cancer cachectic mice. **Exp Physiol**. v. 98, p. 1349-  
13 1365, 2013.
- 14 FRANZINI-ARMSTRONG. C; KENNEY, L. J.; VARRIANO-MARSTON, E. The  
15 structure of calsequestrin in triads of vertebrate skeletal muscle: a deep-etch study. **J**  
16 **Cell Biol**. v. 105, p. 49–56, 1987.
- 17 FRYER, M. W.; STEPHENSON, D. G. Total and sarcoplasmic reticulum calcium  
18 contents of skinned fibers from rat skeletal muscle. **J Physiol**. v. 493, p. 357–370,  
19 1996.
- 20 FRONTERA, W. R; OCHALA, J. Skeletal muscle: a brief review of structure and  
21 function. **Calcif Tissue Int**. v. 96, p. 183-195, 2015.

- 1 GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Tratado de Histologia em Cores**. 3. ed. Rio de  
2 Janeiro (RJ): ELSEVIER, 2007.
- 3 GAUTHIER, G. F. On the relationship of ultrastructural and cytochemical features to  
4 color in mammalian skeletal muscle. **Zellforsch.** v. 95, p. 462-482, 1969.
- 5 GOLDSPINK, G. Mechanical signals, IGF-I gene splicing, and muscle adaptation.  
6 **Physiology**. v. 20, p. 232-238, 2005.
- 7 GORDON, J. N.; GREEN, S. R.; GOGGIN, P. M. Cancer cachexia. **QJM**. v. 98, p.  
8 779-788, 2005.
- 9 GUARNIER, F. A. et al. Time course of skeletal muscle loss and oxidative stress in  
10 rats with Walker 256 solid tumor. **Muscle nerve**. v. 42, p. 950-958, 2010.
- 11 HANAI, J. I. et al. The muscle-specific ubiquitin ligase atrogin-1/MAFbx mediates  
12 statin-induced muscle toxicity. **J Clin Invest**. v. 117, p, 3940–3951, 2007.
- 13 HALLIWELL, B; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 4.  
14 ed. Oxford: Oxford University Press, 2007.
- 15 HOHN, A.; KONIG, J.; GRUNE, T. Protein oxidation in aging and the removal of  
16 oxidized proteins. **J Proteomics**. v. 92, p. 132-159, 2013.
- 17 KHAWLI, F. A.; REID, M. B. N-acetylcysteine depresses contractile function and  
18 inhibits fatigue of diaphragm in vitro. **J Appl Physiol**. v. 77, p. 317–324, 1994.

- 1 INESI, G. de MEIS, L. Regulation of steady state filling in sarcoplasmic reticulum.  
2 Roles of back-inhibition, leakage, and slippage of the calcium pump. **J Biol Chem.** v.  
3 264, p. 5929–5936, 1989.
- 4 JONES, D. Redefining oxidative stress. **Antioxid Redox Signal.** v. 8, p. 1865-1879,  
5 2006.
- 6 JORGENSEN, A. O. Ultrastructural localization of calsequestrin in rat skeletal muscle  
7 by immunoferritin labeling of ultrathin frozen sections. **J Cell Biol.** v. 97, p. 1573–  
8 1581, 1983.
- 9 JOSE, C., et al. Mitoplasticity: adaptation biology of the mitochondrion to the cellular  
10 redox state in physiology and carcinogenesis. **Antioxid Redox Signal.** v. 18, p. 1-42,  
11 2012.
- 12 JOZA, N., et al. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in  
13 programmed cell death. **Nature.** v. 410, p. 549–554, 2001.
- 14 JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Biologia Celular e Molecular.** 9a Edição, Editora  
15 Guanabara e Koogan, Rio de Janeiro, 2011.
- 16 JÜRGENS, K. D. Etruscan shrew muscle: the consequences of being small. **J Exp**  
17 **Biol.** v. 205, p. 2161-2166, 2002.

- 1 LAMBOLEY, C. R. et al. Effect of 23-day muscle disuse on sarcoplasmic reticulum  
2 Ca<sup>2+</sup> properties and contractility in human type I and type II skeletal muscle fibers. **J**  
3 **Appl Physiol.** v. 121, p. 483-492, 2016.
- 4 LECKER, S. H. et al. Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common  
5 program of changes in gene expression. **Faseb J.** v. 18, p, 39–51, 2004.
- 6 LI, Y. P. Hydrogen peroxide stimulates ubiquitin-conjugating activity and expression  
7 of genes for specific E2 and E3 proteins in skeletal muscle myotubes. **Am J Physiol**  
8 **Cell Physiol.** v. 285, p. 806–812, 2003.
- 9 LI, P. et al. Oxidative phenotype protects myofibers from pathological insults induced  
10 by chronic heart failure in mice. **Am J Pathol.** v. 170, p, 599–608, 2007.
- 11 LIU, X. et al. Mitochondrial ‘kiss-and-run’: interplay between mitochondrial motility  
12 and fusion–fission dynamics. **The EMBO Journal.** v. 28, p. 3074-3089, 2009.
- 13 LIBERA, L. D.; CARPENE, E. Myosin heavy and light chains and myosin light chain  
14 kinase in skeletal and smooth muscle of some wild avian species. **Comp Biochem**  
15 **Physiol.** v. 116, p. 45-50, 1997.
- 16 MAMMUCARI, C. et al. The mitochondrial calcium uniporter controls skeletal muscle  
17 trophism in vivo. **Cell Rep.** v. 10, p. 1269-1279, 2015.
- 18 MARTIGNONI, M.E.; KUNZE, P.; FRIESS, H. Cancer cachexia. **Mol Cancer.** v. 2,  
19 p.1-3, 2003.

- 1 MASELLA, R. et al. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in  
2 biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. **J**  
3 **Nutr Biochem.** V. 16, P. 577-586, 2005.
- 4 MATECKI, S. et al. Leaky ryanodine receptors contribute to diaphragmatic weakness  
5 during mechanical ventilation. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 113, p.9069-9074,  
6 2016.
- 7 McCLUNG, J. M.; et al. Caspase-3 regulation of diaphragm myonuclear domain  
8 during mechanical ventilation-induced atrophy. **Am J Respir Crit Care Med.** v. 175,  
9 p. 150–159, 2007.
- 10 MOLDÉUS, P.; COTGREAVE, I. A. N-Acetylcysteine. In: PACKER. L. (Org.).  
11 **Methods in Enzymology.** San Diego: Ed. Academic Press. v. 234, p. 482-492,  
12 1994.
- 13 MORAIS, H.; et al. Decreased response to cAMP in the glucose and glycogen  
14 catabolism in perfused livers of Walker-256 tumor-bearing rats. **Mol Cell Biochem.** v.  
15 368, p. 9-16, 2012.
- 16 MURGIA, M. et al. Single muscle fiber proteomics reveals unexpected mitochondrial  
17 specialization. **EMBO Rep.** v. 16, p, 387-395, 2015.
- 18 MURPHY, R. M. et al. Calsequestrin content and SERCA determine normal and  
19 maximal Ca<sup>2+</sup> storage levels in sarcoplasmic reticulum of fast- and slow-twitch fibres  
20 of rat. **J Physiol.** v. 587, p. 443-460, 2009.

- 1 NOVÁK, P.; ZACHAŘOVÁ, G.; SOUKUP, T. Individual, Age and Sex Differences in  
2 Fiber Type Composition of Slow and Fast Muscles of Adult Lewis Rats: Comparison  
3 With Other Rat Strains. **Physiol. Res.** v. 59, p. 783-801, 2010
- 4 SANDRI, M. et al. PGC-1alpha protects skeletal muscle from atrophy by suppressing  
5 FoxO3 action and atrophy-specific gene transcription. **Proc Natl Acad Sci USA.** v.  
6 103, p. 16260–16265, 2006.
- 7 SITTE, N. et al. Proteasome inhibition by lipofuscin/ceroid during postmitotic aging of  
8 fibroblasts. **Faseb J.** v. 14, p. 1490–1498. 2000.
- 9 NEWMAYER, D. D.; FERGUSON-MILLER, S. Mitochondria: releasing power for life  
10 and unleashing the machineries of death. **Cell.** v. 112. p, 481–490, 2003.
- 11 OGATA, T.; MURATA, F. Cytological features of three fiber types in human striated  
12 muscle. **J Exp Med.** v. 99, p. 225-245, 1969.
- 13 PAOLINI, C. et al. Reorganized stores and impaired calcium handling in skeletal  
14 muscle of mice lacking calsequestrin-1. **J Physiol.** v. 583 (part 2), p. 767-784, 2007.
- 15 PICARD, M.; HEPPLER, R. T.; BURELLE, Y. Mitochondrial functional specialization in  
16 glycolytic and oxidative muscle fibers: tailoring the organelle for optimal function. **Am**  
17 **J Physiol Cell Physiol.** v. 302, p. 629-641, 2012.
- 18 PIETRANGELO, L. et al. Age-dependent uncoupling of mitochondria from Ca<sup>2+</sup>  
19 release units in skeletal muscle. **Oncotarget.** v. 6, p. 35358-35371, 2015.

- 1 POWERS, S. K.; KAVAZIS; A. N.; DERUISSEAU; K. C.; Mechanisms of disuse  
2 muscle atrophy: role of oxidative stress. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.**  
3 v. 288, p. 337–344, 2005.
- 4 POWERS, S. K.; KAVAZIS; A. N.; MCCLUNG, J. M.; Oxidative stress and disuse  
5 muscle atrophy. **J Appl Physiol.** v. 102, p. 2389–2397, 2007.
- 6 POWERS, S. K.; et al. Reactive oxygen species are signaling molecules for skeletal  
7 muscle adaptation. **Exp Physiol.** v. 94, p. 1-9, 2009.
- 8 PRIMEAU, A. J.; ADHIHETTY, P. J.; HOOD, D. A.; Apoptosis in heart and skeletal  
9 muscle. **Can J Appl Physiol.** v. 27, p. 349–395, 2002.
- 10 RASMUSSEN, H. et al. Calcium ion as second messenger. **Clin Endocrinol.** 1976.
- 11 REILLY, P. M.; SCHILLER, H. J.; BULKLEY, G. B. Pharmacologic approach to tissue  
12 injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. **Am J Surg.**  
13 v. 161, p. 488–503, 1991.
- 14 ROMANELLO, V. et al. Mitochondrial fission and remodelling contributes to muscle  
15 atrophy. **EMBO Journal.** v. 29, p. 1774-1785, 2010.
- 16 ROMANELLO, V.; SANDRI, M. Mitochondrial biogenesis and fragmentation as  
17 regulators of muscle protein degradation. **Curr Hypertens Rep.** v. 12, p. 433-439,  
18 2010.
- 19 REID, M.B. et al. N-acetylcysteine inhibits muscle fatigue in humans. **J Clin Invest.**  
20 v. 94, p. 2468–2474, 1994.

- 1 ROSSI, A. E; DIRKSEN, R. T. Sarcoplasmic reticulum: the dynamic calcium governor  
2 of muscle. **Muscle Nerve**. v. 33, p. 715-731. 2006.
- 3 ROSSI, A. E. Differential impact of mitochondrial positioning on mitochondrial Ca(2+)  
4 uptake and Ca(2+) spark suppression in skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*.  
5 v. 301, p. 1128-1139, 2011.
- 6 RUBIN, H. Cancer cachexia: Its correlations and causes. **Proc Natl Acad Sci USA**.  
7 v. 100, p. 5384-5389, 2003.
- 8 RUFFMANN, R; WENDEL, A. GSH rescue by N-acetylcysteine. **Klin Wochenschr**.  
9 v. 69, p. 857-862, 1991.
- 10 SACCHETTO, R. et al. Postnatal development of rabbit fast-twitch skeletal muscle:  
11 accumulation, isoform transition and fibre distribution of calsequestrin. **J Muscle Res**  
12 **Cell Motil**. v.14, p. 646–653, 1993.
- 13 SCHIAFFINO, S. et al. Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy.  
14 **The FEBS Journal**. v. 280, p. 4294-4314, 2013.
- 15 SCHIAFFINO, S.; HANZLIKOVFI, V.; PIEROBON, S. Relations between structure  
16 and function in rat skeletal muscle fibers. **J Cell Biol**. v. 47, p. 107-119, 1970.
- 17 SCHIAFFINO, S.; REGGIANI, C. Fiber types in mammalian skeletal muscle. *Physiol*  
18 *Rev*. v. 91, p. 1447-1531, 2011.
- 19 SHIMIZU, M. H. et al. N-acetylcysteine attenuates the progression of chronic renal  
20 failure. **Kidney Int**. v. 68, p. 2208-2217, 2005.

- 1 SHINDOH, C. et al. Effect of N-acetylcysteine on diaphragm fatigue. **J Appl Physiol.**  
2 v. 68, p. 2107–2113, 1990.
- 3 SILVA, M. D. P.; CARVALHO, R. F. Mecanismos celulares e moleculares que  
4 controlam o desenvolvimento e o crescimento muscular. **Revista Brasileira de**  
5 **Zootecnia.** v. 36, p. 21-31, 2007.
- 6 SMITH, I. C. et al. ATP Consumption by Sarcoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup> Pumps  
7 Accounts for 40-50% of Resting Metabolic Rate in Mouse Fast and Slow Twitch  
8 Skeletal Muscle. **Plos One.** v. 8, p. 1-11, 2013.
- 9 TRACHOOTHAM, D.; ALEXANDRE, J.; HUANG, P. Targeting cancer cells by ROS-  
10 mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? **Nat Rev Drug Discov.** v. 8,  
11 p. 578-591, 2009.
- 12 TERRILL, J. R. et al. N-Acetylcysteine treatment of dystrophic mdx mice results in  
13 protein thiol modifications and inhibition of exercise induced myofibre necrosis.  
14 **Neuromuscul Disord.** v. 22, p. 427–434, 2011.
- 15 TISDALE, M. J. Cancer anorexia and cachexia. **Nutrition.** v. 17, p. 438-442, 2001.
- 16 TISDALE, M. J. Cancer cachexia. **Curr Opin Gastroenterol.** v. 26, p. 146-51, 2010.
- 17 TOMANEK, R. J. et al. Fine structure of fast-twitch and slow-twitch guinea pig  
18 muscle fibers. **J Morphol.** v. 139, p. 47-66, 1973.
- 19 VAN SURELL, C. Effects of N-acetylcysteine on diaphragmatic function and  
20 malondialdehyde content in Escherichia coli endotoxemic rats. **Am Rev Respir Dis.**  
21 v. 146, p. 730–734, 1992.

- 1 VITORINO, R.; MOREIRA-GONÇALVES, D.; FERREIRA, R. Mitochondrial plasticity  
2 in cancer-related muscle wasting: potential approaches for its management. **Curr**  
3 **Opin Clin Nutr Metab Care**. v. 18, p. 226-233. 2015.
- 4 VYAS, S. Mitochondria and cancer. **Cell**. v. 166, p. 555-566, 2016.
- 5 WALSMITH, J.; ROUBENOFF, R. Cachexia in rheumatoid arthritis. **Int J Cardiol**. v.  
6 85, n. 1, p. 89-99, 2002.
- 7 WARREN, S. The immediate cause of death in cancer. **Am J Med Sci**. v. 184, p.  
8 610-613, 1932.
- 9 XU, K. Y.; ZWEIER, J. L.; BECKER, L. C. Hydroxyl radical inhibits sarcoplasmic  
10 reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase function by direct attack on the ATP binding site. **Circ Res**. v.  
11 80, p. 76–81, 1997.

## **Apêndice A**



Universidade  
Estadual de Londrina

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA N° 069/2015

Londrina, 28 de Maio de 2015.

ACEITO

Prezada Pesquisadora,

A CEUA/UEL reunida em 31 de Março de 2015 avaliou o projeto de pesquisa intitulado "Papel da **N-acetilcisteína** no processo de perda de massa muscular durante a caquexia induzida experimentalmente por tumor de Walker-256: comparação de administração por via oral e via intraperitoneal", registrado sob o processo CEUA n°1788.2015.50 e 6682.2015.58, pesquisa do Centro de Ciências Biológicas, desenvolvido sob sua responsabilidade. Esclarecidos os aspectos metodológicos solicitados, o projeto está **aprovado** para execução entendendo-se que os princípios éticos postulados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal estão respeitados.

Serão utilizados 160 ratos Wistar machos, pesando de 130 e 150 g e provenientes do Biotério Central da UEL. O projeto tem como objetivo avaliar os efeitos da administração de NAC em diferentes doses em ratos Wistar saudáveis e portadores da forma sólida do tumor de Walker-256. Para a indução do tumor, serão implantadas  $8,0 \times 10^7$  células viáveis subcutaneamente (s.c) na porção lateral da pata posterior direita (flanco direito) do animal diluídas em 500  $\mu$ L de PBS induzindo caquexia e os animais serão divididos em 20 grupos experimentais compostos por presença ou ausência de tumor de Walker, formas de administração de N-acetilcisteína (gavage ou intraperitoneal) e dosagem de N-acetilcisteína (150, 200 e 250 mg/kg e 25, 50, 100, 150, 200 e 250 mg/kg). Os protocolos experimentais estão aprovados com previsão para execução em 23 meses.

Cumpre 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.

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

Waldiceu Ap. Verrri Junior  
Prof. Dr. Waldiceu Aparecido Verrri Junior  
Coordenador da CEUA/UEL

Ilma. Sra.

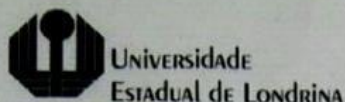
**Profa. Dra. Flavia Alessandra Guarnier**

Coordenadora do Projeto

Departamento de Ciências Patológicas

Centro de Ciências Biológicas

Com cópia para Sra. Edilamar dos Anjos (Chefe da DCA/PROPPG), Luiz Carlos Juliani (Diretor do Biotério Central da UEL), Chefe do Departamento de Ciências Patológicas e Diretor(a) do Centro de Ciências Biológicas.



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 143/2016

Londrina, 14 de Julho de 2016.

Prezada Pesquisadora,

*Tratado*

Certificamos que o projeto intitulado "**Plasticidade mitocondrial e de reticulo sarcoplasmático no músculo estriado esquelético de animais portadores da forma sólida do tumor de Walker-256**", protocolo CEUA nº **7407.2016.88**, sob a responsabilidade de **Flávia Alessandra Guarnier**, 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 nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL), em reunião realizada em **05/07/2016**.

O objetivo do projeto é avaliar a plasticidade mitocondrial e de reticulo sarcoplasmático no músculo estriado esquelético de ratos Wistar portadores da forma sólida do tumor de Walker-256, no 5º e 10º dias após a implantação do tumor. Para isso todos os animais serão submetidos a Inoculação subcutânea de 0,5 mL de PBS ou  $8 \times 10^7$  de células viáveis no flanco direito. Após isso serão divididos em 4 grupos (8 animais cada grupo/2 ensaios). Aguardo do prazo de 5 ou 10 dias. No dia da coleta, os animais serão sedados para realização de punção cardíaca. Serão eutanasiados por deslocamento cervical e posterior coleta dos músculos gastrocnêmio, sóleo, extensor longo dos dedos e tibial anterior. GI 2.

Vigência do Projeto	01/06/2016 a 01/06/2019
Espécie/linhagem	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	64
Peso/Idade	180-200g / Indeterminado
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central / UEL
Amostras a serem coletadas	Músculo gastrocnêmio, músculo sóleo, músculo extensor longo dos dedos, músculo tibial anterior

Cumpra-se 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.

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

*9/11*  
Profa. Dra. Glaura Scantamburlo Alves Fernandes  
Coordenadora da CEUA/UEL

Ilma. Sra.

**Profa. Dra. Flávia Alessandra Guarnier**

Coordenadora do Projeto

Departamento de Ciências Patológicas / Centro de Ciências Biológicas

Com cópia Waldiceu A. Verrí Junior (Coord. do Biotério Central/UEL); Chefe do Departamento de Ciências Patológicas e Diretor(a) do Centro de Ciências Biológicas

Campus Universitário: Rodovia Celso Garcia Cid (PR 445), km 380 - Fone (043) 3371-4000 PARANÁ - Fax 3328-4440 - Caixa Postal 10.811 - CEP 86057-970 - Internet <http://www.uel.br>

LONDRINA - PARANÁ - BRASIL