



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

MAYRA TARDELLI DE JESUS TESTA

**EFEITO DO TREINAMENTO RESISTIDO NA CAQUEXIA DO  
CÂNCER E NO DESENVOLVIMENTO TUMORAL EM  
CAMUNDONGOS PORTADORES DO TUMOR DE EHRLICH**

---

Londrina  
2018

MAYRA TARDELLI DE JESUS TESTA

**EFEITO DO TREINAMENTO RESISTIDO NA CAQUEXIA DO  
CÂNCER E NO DESENVOLVIMENTO TUMORAL EM  
CAMUNDONGOS PORTADORES DO TUMOR DE EHRLICH**

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação Associado em Educação Física UEM/UEL, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Educação Física.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Deminice

Londrina

2018

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

TESTA, MAYRA TARDELLI DE JESUS.

EFEITO DO TREINAMENTO RESISTIDO NA CAQUEXIA DO CÂNCER E NO DESENVOLVIMENTO TUMORAL EM CAMUNDONGOS PORTADORES DO TUMOR DE EHRlich / MAYRA TARDELLI DE JESUS TESTA. - Londrina, 2018.  
58 f.: il.

Orientador: RAFAEL DEMINICE.

Coorientador: POLIANA CAMILA MARINELLO.

Dissertação (Mestrado em Educação Física) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Educação Física e Esportes, 2018.

Inclui bibliografia.

1. Estudo sobre quais mecanismos o treinamento resistido pode amenizar a caquexia no câncer - Tese. I. DEMINICE, RAFAEL . II. MARINELLO, POLIANA CAMILA. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Educação Física e Esportes. . IV. Título.

MAYRA TARDELLI DE JESUS TESTA

**EFEITO DO TREINAMENTO RESISTIDO NA CAQUEXIA DO CÂNCER  
E NO DESENVOLVIMENTO TUMORAL EM CAMUNDONGOS  
PORTADORES DO TUMOR DE EHRLICH**

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação Associado em Educação Física UEM/UEL, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Educação Física.

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

Prof. Dra. Flávia Alessandra Guarnier  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof. Dr. Rodrigo Cabral Luiz  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 15 de junho de 2018.

Dedico este trabalho à minha família; meu pai Gilberto, minha mãe Simone e ao meu marido Luis César, pelo incentivo e apoio para esta conquista.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, por me abençoar e iluminar sempre, me dando a cada dia forças para lutar e acreditar em tudo o que me faz feliz e realizada. Aos meus pais, pois me ensinaram a buscar meus sonhos, realizá-los sempre de cabeça erguida, e nunca me deixaram desistir nos momentos mais difíceis. Obrigada mãe e pai, por serem esse exemplo em minha vida. Aos meus irmãos, não parece que moramos na mesma cidade, devido à correria do dia a dia, sei que sempre torceram por mim, obrigada. Ao meu marido, Luis Cesar, que já participou de alguns acontecimentos e com certeza participará de muitos ainda, obrigada por me ajudar, incentivar a estudar e a construir um futuro. E a todos os meus familiares, tias, tios, primos, avó, que também me apoiam e reclamam da minha ausência, mas prometo compensar. À minha filhada (Bianca) e sobrinha (Maria Luisa), que não entendem muito bem o que faço, porém são minhas inspirações para cada conquista.

Ao meu orientador, Rafael Deminice, que é um grande professor, faz as coisas parecerem tão fáceis, não mede esforços para nos ajudar no laboratório e é um grande exemplo para todos nós, obrigada por ter me aceitado como aluna e por proporcionar todo o aprendizado que conquistei. Espero poder continuar fazendo parte dessa grande equipe, tanto aprendendo quanto colaborando. Não poderia deixar de falar dos meus companheiros de laboratório, as principais que estiveram sempre ao meu lado, Paola e Poliana, que nesse último ano se tornaram essenciais, a Camila que também foi muito importante quando entrei no laboratório, obrigada meninas! E aos outros que estiveram sempre por perto, Diogo, Donizete, Vitor, Fernando e Philippe, e que sempre estiveram dispostos a ajudar.

Muito obrigada a todos que fizeram parte desse processo e que de alguma forma contribuíram para que esse sonho se concretizasse, obrigada!

Agradeço à CAPES e a Fundação Araucária, pelo apoio financeiro.

TESTA, Mayra Tardelli de Jesus. **Efeito do treinamento resistido na caquexia do câncer e no desenvolvimento tumoral em camundongos portadores do tumor de Ehrlich**. 2018. 58f. Dissertação (Mestrado em Educação Física) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

## RESUMO

A caquexia induzida pelo câncer é uma síndrome metabólica caracterizada por progressiva perda de peso corporal não intencional. Estudos mostram que essa perda de peso relaciona-se com o desbalanço entre síntese e degradação proteica. O exercício tem demonstrado grande importância neste contexto, a fim de prevenir, retardar ou reverter a caquexia induzida pelo câncer. O objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos do treinamento resistido (TR) sobre a caquexia e a agressividade tumoral em camundongos inoculados com células tumorais de Ehrlich. Foram utilizados 40 camundongos Swiss machos ( $30,15 \pm 2,87$ g), divididos aleatoriamente em 4 grupos (n=10 por grupo): controle (C), tumor (T), exercício (E) e tumor exercício (TE). Os animais T e TE foram inoculados com  $1 \times 10^6$  células do tumor de Ehrlich subcutaneamente no flanco direito. O protocolo de TR consistiu em 4 semanas, onde os animais subiram uma escada com pesos progressivos atados à cauda. Ao final do período experimental, os animais foram eutanasiados. O crescimento tumoral foi progressivo nos grupos portadores de tumor e o TR não reduziu a massa tumoral. O grupo T apresentou menor ganho de peso corporal (69%, quando comparado ao C) e o TR não amenizou a perda de peso. O tumor promoveu diminuição (16%) na ingestão de ração, na massa da gordura retroperitoneal (61%), na massa total dos músculos analisados (15%) e o TR não reverteu nenhum desses parâmetros. Observou-se aumento da massa do baço (435%, T vs C) e o exercício não foi capaz de reverter esse aumento. A análise da área de secção transversa demonstrou que o grupo T apresentou redução no músculo sóleo, EDL e gastrocnêmio (59%, 54% e 28%, respectivamente) quando comparados ao C, e o TR exerceu efeito protetor sobre esse parâmetro com aumento de 172%, 157% e 80%, respectivamente. O grupo T apresentou redução (23%) da carga máxima, diminuição da capacidade locomotora (57%) e exploratória (80%), dentre todos esses parâmetros o TR preveniu a perda de força (200%). O tumor promoveu aumento de 224% no TNF- $\alpha$  e de 1635% na IL-6 circulantes, aumentou (71%) ainda a porcentagem da polpa branca do baço em relação à área total da foto analisada, quando comparados ao grupo C. Os níveis de IL-10 circulantes não se alteraram. O exercício não preveniu o aumento de TNF- $\alpha$  e a porcentagem da polpa branca no baço, no grupo TE, porém, reduziu os níveis de IL-6 do grupo TE em 69% quando comparado ao T. A expressão gênica muscular analisada demonstrou aumento (99%, 134% e 179%) de RNA mensageiro de, FOXO1, FOXO3 e atrogin-1, respectivamente e diminuição (53%) de PGC-1 $\alpha$ . O TR foi capaz de reduzir (FOXO1 - 45%, FOXO3 - 42% e atrogin-1 - 55%) e de aumentar (163%) PGC-1  $\alpha$ . O tumor e o treinamento não alteraram as proteínas musculares atrogin-1 e MuRF-1 analisadas por *western blotting* no músculo gastrocnêmio. Ainda, a análise tumoral demonstrou diminuição da cápsula (51,15%) e da proliferação das células tumorais (10,50%) e aumento (47,44%) da área de fibrose central, no grupo TE. Concluindo, o TR minimizou a perda de massa e de força muscular promovidas pelo crescimento tumoral, embora a esplenomegalia e a

lipólise não tenham sido revertidas. O TR também diminuiu a proliferação e aumentou a morte de células tumorais, o que pode ter contribuído para a diminuição da agressividade tumoral, trazendo benefícios para os pacientes com câncer.

**Palavras-chave:** Caquexia do câncer. Síntese e Degradação proteica. Treinamento resistido.

TESTA, Mayra Tardelli de Jesus. **Effect of resistance training on cancer cachexia and tumoral development in mice bearing Ehrlich tumor**. 2018. 58p. Dissertation (Mester in Physical Education) – State University of Londrina, Londrina, 2018.

### ABSTRACT

Cancer-induced cachexia is a metabolic disorder characterized by unintentional and progressive body weight loss. Studies show that this weight loss is related to the imbalance between protein synthesis and degradation. Exercise has shown great importance in this regard in order to prevent, delay or reverse cancer-induced cachexia. The objective of this study was to evaluate the effects of resistance training (RT) on cachexia and tumor aggressiveness in mice inoculated with Ehrlich tumor cells. Fourty male Swiss mice ( $30.15 \pm 2.87g$ ) were randomly divided into four groups (n = 10 per group): control (C), tumor (T), exercise (E) and tumor exercise (TE). The T and TE animals were inoculated with  $1 \times 10^6$  Ehrlich tumor cells subcutaneously on the right flank. The RT protocol consisted of a 4-week, where the animals climbed a ladder with progressive weight loads attached to their tails. At the end of the experimental period animals were euthanized. Tumor growth was progressive in tumor bearing groups and RT did not reduce tumor mass. The T group gained less body weight (69%, when compared to C) and RT did not reduce weight loss. The tumor promoted a decrease (16%) in food intake, retroperitoneal fat mass (61%), in the total mass of the analyzed muscles (15%), and RT did not reverse any of these parameters. Increased spleen mass was observed (435%, T vs C) and exercise was not able to reverse this increase. Analysis of the cross-sectional area showed that the T group had a reduction in the soleus, EDL and gastrocnemius muscles (59%, 54% and 28%, respectively) when compared to the C group, and the RT exerted a protective effect on this parameter with an increase of 172%, 157% and 80% in these respective muscles (TE vs T). The T group presented a reduction of the maximum load (23%), a decrease in locomotor and exploratory capacity (57% and 80%, respectively), but RT prevented strength loss (200%). The tumor promoted a 224% increase in TNF- $\alpha$  and 1635% in circulating IL-6, increased the percentage of the white pulp of the spleen in 71% in relation to the total area of the analyzed photo, when compared to group C. The levels of circulating IL-10 did not change. The exercise did not prevent the increase of TNF- $\alpha$  and the percentage of the white pulp in the spleen in the TE group, however, it reduced IL-6 levels of the TE group by 69% when compared to T. The muscle gene expression analyzed showed an increase (99%, 134% and 179%) of the messenger RNA of, FOXO1, FOXO3 and atrogin-1, respectively, a decrease (53%) of PGC-1 $\alpha$ . RT was able to reduce (FOXO1 - 45%, FOXO3 - 42% and atrogin-1 - 55%) and increase (163%) PGC-1 $\alpha$ . Tumor and RT did not alter the muscle proteins atrogin-1 and MuRF-1 analyzed by western blotting in the gastrocnemius muscle. Still, the tumor analysis results showed a decrease in capsule size (51.15%) and proliferation of tumor cells (10.50%) and an increase (47.44%) in the central fibrosis area in the TE group. In conclusion, RT minimized the loss of mass and muscle strength promoted by tumor growth, although splenomegaly and lipolysis were not reversed. RT also decreased proliferation and increased the death of tumor cells, which may contribute to a decrease in tumor aggressiveness, leading to numerous benefits to cancer patients.

**Keywords:** Cancer cachexia. Synthesis and Degradation protein. Resistance training.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Imagem representativa da via proteolítica ubiquitina-proteassoma (SUP).....23
- Figura 2** - Imagem representativa do delineamento experimental, realizado por um período de 4 semanas. Os animais dos grupos T e TE foram inoculados com células tumorais, posteriormente todos os grupos foram submetidos ao teste de carga máxima e durante 4 semanas os animais do grupo E e TE realizaram o treinamento. ....28
- Figura 3** - Imagem ilustrativa da escada de treinamento resistido utilizada para o treinamento dos animais, em (A) câmara de descanso e em (B) degraus da escada. ....31
- Figura 4** - Imagens ilustrativas do processamento dos dados. Imagem da câmera digital (Longitech, modelo c920, 30Hz (A), resultado do processo de segmentação (B), resultado do processo de rastreamento (C). ....32
- Figura 5** - Imagem ilustrativa do equipamento rotarod. ....33
- Figura 6** - Volume tumoral (A), ganho de peso sem tumor (B), ingestão de ração (C) gordura retroperitoneal (D), músculos (E) e baço (F) em camundongos controle (C), portadores da forma sólida do tumor Ehrlich (T), exercitados (E) e portadores da forma sólida do tumor Ehrlich e exercitados (TE). ....38
- Figura 7** - Análise da área de secção transversa dos músculos sóleo, EDL e gastrocnêmio após coloração com hematoxilina e eosina (HE). % da ocorrência de fibras com diferentes tamanhos nos grupos C, T, E, TE (A), distribuição de áreas analisadas ( $\mu\text{m}^2$ ) (B) e imagens ilustrativas da área de secção transversa (C). ....40
- Figura 8** - Variação da carga máxima (A), rotarod (B), distância percorrida (C) e número de cruzamentos no centro da caixa (B) após 4 semanas. ....41
- Figura 9** - Marcadores pró-inflamatórios sistêmicos: TNF- $\alpha$  (A), IL-6 (B), marcador anti-inflamatório sistêmico: IL-10 (C) e análise da polpa branca do baço (D) após 4 semanas. ....42

- Figura 10** - Expressão gênica muscular analisada por RT-PCR das proteínas FOXO1 (A), FOXO3 (B), Atrogin-1 (C) e PGC-1 $\alpha$  (D). Análise das proteínas musculares Atrogin-1 (E) e MuRF-1 (F) pela técnica de Western Blotting após 4 semanas..... 43
- Figura 11** - Tamanho da cápsula tumoral (A) grupo T, TE; % de área central tumoral marcada com cor vermelha Sirius (B) grupo T, TE; % de área tumoral marcada pelo antígeno Ki67 (C) grupo T, TE; quantificação da apoptose (D), realizado pela técnica de TUNEL, peso do tumor (g) (E) de camundongos ..... 44

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Parâmetros envolvidos na caquexia e sarcopenia .....	21
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

Akt	Protein kinase B
ASTr	Área de secção transversa
ATP	Adenosina trifosfato
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FOXO	Fator de transcrição <i>forkhead</i>
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IGF-1	Insulin Growth Factor
IL-1	Interleucina-1
IL-6	Interleucina-6
IL-10	Interleucina-10
MuRF-1	Muscle RING-finger protein-1
NF- $\kappa$ B	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
TNF- $\alpha$	Tumor Necrosis Factor
TR	Treinamento resistido
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling
PIF	Proteolysis-inducing factor
PGC-1 $\alpha$	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha
SUP	Sistema ubiquitina-proteassoma

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	18
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	19
3.1	OBJETIVO GERAL .....	19
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	19
<b>4</b>	<b>HIPÓTESE</b> .....	19
<b>5</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	20
5.1	CAQUEXIA DO CÂNCER .....	20
5.2	O TUMOR DE EHRLICH E O ESTUDO DA CAQUEXIA NO CÂNCER .....	21
5.3	ANABOLISMO E CATABOLISMO PROTEICO.....	22
5.4	MEDIADORES INFLAMATÓRIOS RELACIONADOS COM A CAQUEXIA .....	24
5.5	INFLAMAÇÃO E PERDA DE MASSA MUSCULAR .....	25
5.6	O TREINAMENTO RESISTIDO .....	26
<b>6</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	27
6.1	ANIMAIS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	27
6.2	MANUTENÇÃO E INOCULAÇÃO DO TUMOR .....	28
6.3	TESTE DE CARGA MÁXIMA .....	29
6.4	PROTOCOLO DE TREINAMENTO RESISTIDO.....	30
6.5	TESTE DE CAMPO ABERTO (OPEN FIELD TEST) .....	31
6.6	TESTE ROTAROD .....	32
6.7	EUTANÁSIA, COLETA E PREPARO DOS TECIDOS .....	33
6.8	ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA DAS FIBRAS MUSCULARES .....	34
6.9	CITOCINAS PLASMÁTICAS.....	34
6.10	ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA DO BAÇO .....	34
6.11	QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA MUSCULAR – RT- PCR .....	35
6.12	<i>IMUNOBLOTTING</i> .....	35

6.13	HISTOLOGIA E IMUNOHISTOQUÍMICA DO TUMOR PARA MEDIDA DE AGRESSIVIDADE TUMORAL.....	35
7	<b>ANÁLISE ESTATÍSTICA</b> .....	36
8	<b>RESULTADOS</b> .....	37
	REFERÊNCIAS .....	52
	ANEXO 1. PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA .....	57

## 1 INTRODUÇÃO

A caquexia é definida como uma complexa síndrome multifatorial associada a diversas doenças e caracterizada pela progressiva perda de peso com redução da massa muscular, com ou sem depleção do tecido adiposo, não podendo ser revertida totalmente com suporte nutricional convencional (TISDALE, 2009). Estudos apontam que aproximadamente 50% dos pacientes com câncer sofrem desta síndrome (TISDALE, 2009), que em geral promove redução da mobilidade, da função muscular e aumento da fadiga (BATISTA *et al.*, 2012; TISDALE, 2009). Onesti; Guttridge (2014) demonstraram um aumento de 45% na mortalidade a cada 1000 mm<sup>2</sup> de diminuição na área de secção transversa do tecido muscular esquelético de pacientes submetidos à cirurgia. A atrofia muscular tem sido utilizada como um marcador clínico da caquexia e está diretamente associado ao prognóstico de pacientes com câncer.

Estudos mostram que a perda da massa muscular associada à caquexia do câncer é decorrente de um desbalanço entre a síntese e a degradação de proteínas (AL-MAJI; WATERS, 2008; YOSHIDA; DELAFONTAINE, 2015). Tal desbalanço é caracterizado pelo aumento da expressão de enzimas essenciais da via proteolítica ubiquitina-proteassoma (HUSSEY *et al.*, 2000), decorrente do aumento da liberação de fatores de indução de proteólise (PIF) pelo tumor, ou ainda através do aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleucina-6 (IL-6) pelo organismo. A inflamação parece exercer papel importantíssimo na caquexia, sendo que o TNF- $\alpha$  é uma das citocinas pró-inflamatórias mais descritas nesse processo. Similarmente, aumento dos níveis de interleucina 1 (IL-1), IL-6 e interferon-  $\gamma$  (IFN-  $\gamma$ ) também já foram relacionados com caquexia (ONESTI; GUTTRIDGE, 2014).

Grande parte dessa capacidade é atribuída ao potencial do treinamento resistido (TR) de promover modificações morfológicas e funcionais no músculo esquelético (CORMIE; MCGUIGAN; NEWTON, 2010), além de ser um potente estimulador para o aumento da síntese proteica (HARTMAN *et al.*, 2006). Estudos demonstram que o TR é capaz de prevenir a perda de massa muscular e diminuir o tamanho tumoral em ratos com câncer (DONATTO *et al.* 2013) e aumentar a força muscular em pacientes com câncer em tratamento quimioterápico (QUIST *et al.*, 2006). Contudo, apesar dos resultados benéficos que o TR tem apresentado na

caquexia do câncer, pouco se sabe a respeito dos mecanismos envolvidos. Para contribuir na elucidação desses mecanismos, a utilização de modelos experimentais eficientes é de extrema importância. Recentemente, Frajacomó e colaboradores (2016) demonstraram que a forma sólida do tumor de Ehrlich é capaz de reproduzir características biológicas e funcionais da caquexia do câncer.

## 2 JUSTIFICATIVA

A caquexia induzida pelo câncer afeta severamente o músculo esquelético, promovendo atrofia, perda de mobilidade e função musculares. O TR é reconhecidamente um grande estimulador do fenótipo muscular, aumentando seu tamanho e capacidade de gerar força. Entretanto, a plasticidade muscular inerente ao TR sob condições adversas impostas pela caquexia do câncer são pouco conhecidas. Nós acreditamos que em condições severas de desbalanço entre a síntese e a degradação de proteínas, como o imposto pelo câncer, o efeito anti-atrófico do TR está associado não somente a sua capacidade de estimular via de síntese, mas também de inibir a superexpressão de moléculas ativadoras da degradação de proteínas no músculo esquelético. Contudo, ainda há uma lacuna na literatura sobre o favorecimento do TR e os mecanismos capazes de modular a plasticidade e força musculares durante a caquexia induzida pelo câncer.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1. OBJETIVO GERAL**

Estudar o efeito do treinamento resistido (TR) sobre a caquexia e a agressividade tumoral em camundongos.

#### **3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Investigar o efeito do TR na massa corporal, muscular e do tecido adiposo;
- Analisar o efeito do TR na capacidade locomotora e força dos animais;
- Investigar a ação do TR na expressão de genes envolvidos na biogênese mitocondrial e atrofia muscular;
- Caracterizar a ação do TR na quantidade de proteínas envolvidas com proteólise muscular;
- Observar o papel do TR na inflamação;
- Determinar a ação do TR sobre o crescimento e agressividade do tumor;

### **4 HIPÓTESE**

O TR atenua a perda da massa muscular por inibir/amenizar a inflamação sistêmica e proteólise muscular induzidas pelo crescimento tumoral.

## 5 REVISÃO DE LITERATURA

### 5.1. CAQUEXIA DO CÂNCER

De acordo com Vineis & Wild (2014), há um aumento na projeção de incidência global de câncer de 12,7 milhões de novos casos em 2008, para 22,2 milhões até 2030. Iniciado em 2003, o relatório mundial de câncer, apresentou que aproximadamente 5,3 milhões de homens e 4,7 milhões de mulheres possuíam a probabilidade de desenvolver um tumor maligno anualmente, sendo que 6,2 milhões poderiam morrer desta doença. A estimativa mais recente (2014) sugere que aproximadamente 14,1 milhões de pessoas no mundo desenvolverão câncer anualmente (McGUIRE, 2016).

A caquexia é definida como uma complexa síndrome multifatorial associada a diversas doenças. Ela é caracterizada pela progressiva perda de peso com redução da massa muscular, com ou sem depleção do tecido adiposo (Tabela 1), não podendo ser totalmente revertida com suporte nutricional convencional. Tal redução da massa muscular pode ocorrer devido ao desbalanço entre síntese e degradação de proteínas miofibrilares (Tabela 1) (FEARON *et al.*, 2011; TISDALE, 2001). Segundo Tan e Fearon (2008) a caquexia afeta significativamente a qualidade de vida, as respostas ao tratamento e está associada à morbidade e mortalidade de pacientes com câncer, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), insuficiência cardíaca crônica, doença renal crônica, AIDS e sepse.

Notam-se inúmeras complicações geradas pela caquexia, dentre elas, algumas são comumente observadas na caquexia do câncer, como taxas de *turnover* orgânico total de proteínas, taxas de síntese e de catabolismo proteico muscular, aumentadas (INUI, 2002; RUBIN, 2003). A perda substancial de massa muscular esquelética se deve ao aumento do catabolismo muscular que ocorre para fornecer ao organismo aminoácidos para a gliconeogênese. Ocorre também a redução na síntese proteica (GOULD *et al.*, 2013; SILVA, 2006), que pode ser resultado da diminuição da concentração plasmática de insulina e da sensibilidade do músculo esquelético ao hormônio (GORDON; KELLEHE; KIMBALL, 2013; SILVA, 2006).

Aproximadamente metade de todos os pacientes com câncer apresenta caquexia e a morte geralmente ocorre quando a perda de peso atinge 30% do peso corporal estável do paciente, sendo a caquexia diretamente responsável por 20% das mortes por câncer (VAUGHAN *et al.*, 2013). Dessa forma, a prevenção da caquexia é importante no tratamento do paciente com câncer, melhorando a sobrevida, aumentando a tolerância ao tratamento antineoplásico, e a qualidade de vida (ARGILÉS *et al.*, 2012).

Tabela 1 - Parâmetros envolvidos na caquexia e sarcopenia

Parâmetros envolvidos na caquexia e sarcopenia		
Parâmetro	Caquexia	Sarcopenia
Perda de peso	Sim	Não
Massa muscular	Diminuída	Diminuída
Gordura	Diminuída	Aumentado
Anorexia	++	+
Gasto energético de repouso	Aumentado	Diminuída
Inflamação (sistêmica)	+++	+
Doenças subjacentes	Sim	Sim/Não
Degradação de proteína muscular	+	+++
Síntese de proteína muscular comprometida	Sim/Não	Sim
Apoptose muscular aumentada	Sim	Sim
Regeneração muscular aumentada	Sim	Sim
Disfunção mitocondrial no músculo	Sim	Sim
Resistência à insulina	Sim	Sim

Fonte: Adaptado de Argilés *et al.*, 2015.

## 5.2. O TUMOR DE EHRLICH E O ESTUDO DA CAQUEXIA NO CÂNCER

A utilização de modelos experimentais em animais é importante para o estudo da caquexia, seus mecanismos e a eficácia/segurança de possíveis intervenções. Contudo, é fundamental que os modelos utilizados se assemelhem ao que é encontrado em humanos.

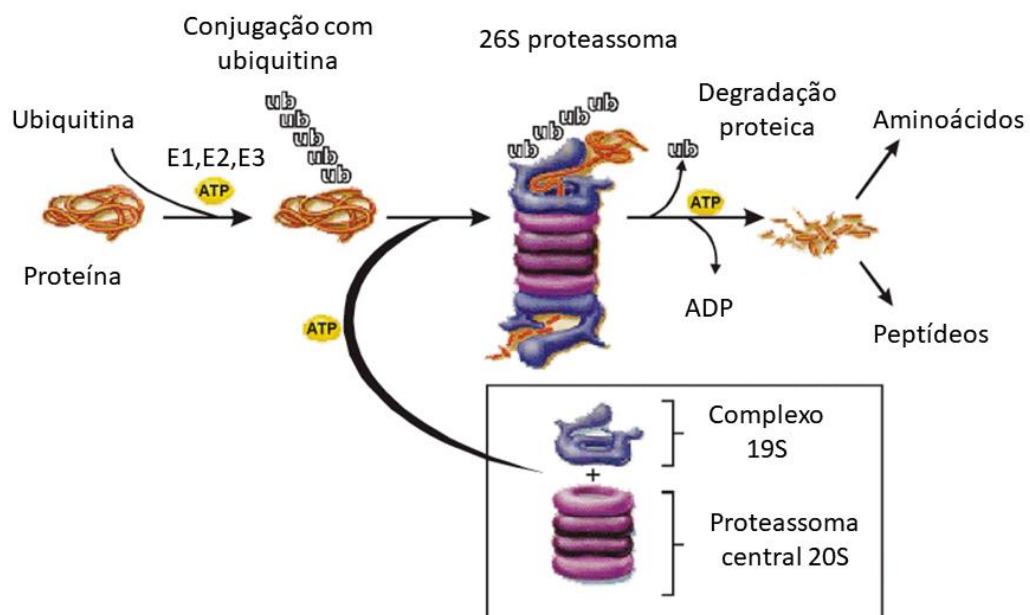
Ballarò et al. (2016), em uma revisão sobre modelos animais para estudar a caquexia do câncer, apresentaram seis modelos experimentais, incluindo os mais utilizados em camundongos, como carcinoma coloretal C26, carcinoma pulmonar de Lewis, adenocarcinoma de cólon MAC 16, melanoma B16, e os mais utilizados em ratos, como o carcinossarcoma mamário de Walker-256 e hepatoma ascítico de Yoshida AH130. Frajacom e colaboradores (2016) demonstraram que o tumor de Ehrlich reproduz de forma eficaz as características biológicas e funcionais da caquexia no câncer, sendo uma alternativa mais eficiente do que outros modelos mais agressivos para estudar a caquexia.

### 5.3. ANABOLISMO E CATABOLISMO PROTEICO

Como exposto, o aumento do catabolismo proteico está frequentemente presente em indivíduos portadores de câncer. Sabe-se que, em condições fisiológicas, para que não haja perda funcional, existem mecanismos que regulam a quebra de proteínas, no intuito de poupar os estoques de nitrogênio e preservar o tecido muscular (BARACOS, 2001). Segundo Argilés e colaboradores (2015), há grande aumento na taxa de proteólise muscular esquelética em pacientes caquéticos. Tal processo ocorre por meio de três vias que são responsáveis pelo catabolismo proteico no músculo esquelético: a) o sistema lisossomal, onde há a quebra de proteínas extracelulares, como os receptores de membrana; b) o sistema das calpaínas, que é uma via de degradação proteica de células eucarióticas constituído de duas enzimas principais, a calpaína e a calpastatina, que sofrem a influência do cálcio intracelular; c) o sistema ubiquitina-proteassoma (SUP), envolvido no processamento e degradação de proteínas, o qual acredita-se ser o responsável pela quebra do conjunto de proteínas intracelulares no músculo (TEIXEIRA *et al.*, 2012).

Um dos sistemas proteolíticos mais importantes, relacionado com a sarcopenia é o SUP, atuando em proteínas essenciais para a regulação do desenvolvimento, diferenciação, proliferação, inflamação, apoptose e outros processos (TEIXEIRA *et al.*, 2012). A via SUP realiza a degradação seletiva de proteínas via hidrólise de adenosina trifosfato (ATP) e a marcação da proteína com uma cadeia de poliubiquitina. Nesse sistema, as proteínas são direcionadas para

degradação pelos proteassomas 20S ou 26S através da ligação covalente de uma cadeia de moléculas de ubiquitina. Inicialmente, a enzima E1 (enzima ativadora de ubiquitina), é ativada em uma reação dependente de energia (ATP), na sequência, ela transfere através da E2 (enzima conjugadora de ubiquitina), a ubiquitina para a E3 (enzima ligase), que catalisa a ligação da ubiquitina à proteína, degradando-a em pequenos peptídeos no proteassoma (ANTHONY, 2016; MACHADO *et al.*, 2009; SANDRI, 2013), como ilustrado na figura 1.



**Figura 1.** Imagem representativa da via proteolítica ubiquitina-proteassoma (SUP). Adaptado de Mitch & Goldberg (1996).

Várias as citocinas pró-inflamatórias são capazes de regular vias anabólicas e catabólicas, influenciando, inclusive, o funcionamento da SUP no músculo esquelético (PENNA *et al.*, 2010) frente à diversos desafios. O IGF-1 é um fator anabólico que estimula a síntese proteica assim como a proliferação e a diferenciação celular, além disso, pode ser regulado por algumas citocinas (PENNA *et al.*, 2010). Na via de sinalização de IGF-1, a proteína quinase B (Akt) desempenha um papel central na integração de respostas anabólicas e catabólicas através da modulação da fosforilação dos seus numerosos substratos (GOULD *et al.*, 2013). Segundo Penna e colaboradores (2010), a ativação da Akt, resulta na mobilização de moléculas específicas relacionadas à síntese proteica, através do metabolismo PI3K/Akt/mTOR. A ativação desse sistema inibe a expressão do fator de transcrição

*forkhead* (FOXO) e de suas ligases específicas atrogin-1 (ou FBXO32) e MuRF-1 (Muscle RING-finger protein-1) no músculo esquelético, responsáveis pela sinalização de ativação de degradação proteica através do SUP. Assim, p IGF-1 quando expresso em concentrações ideais, mantém a síntese proteica ativa.

Além dos fatores bioquímicos, a inatividade física é outro fator importante na supressão proteica em pacientes com câncer e ocorre devido à fraqueza e fadiga aumentada decorrentes da caquexia (SILVA, 2006; TISDALE, 2009). O exercício aumenta a sensibilidade à insulina e conseqüentemente a sinalização de IGF-1, a taxa de síntese proteica e a atividade enzimática antioxidante, podendo levar à supressão da resposta inflamatória e ao aumento da função imunológica (AOYAGI *et al.*, 2015), destacando assim a importância do exercício resistido no estímulo da síntese proteica.

#### 5.4. MEDIADORES INFLAMATÓRIOS RELACIONADOS COM A CAQUEXIA

O status pró-inflamatório sistêmico é uma das principais características que os pacientes portadores de câncer apresentam. A resposta inflamatória surge por conta de alterações metabólicas (ARGILÉS *et al.*, 2014), onde citocinas (glicoproteínas solúveis, de pequeno peso molecular), são produzidas por diversas células do hospedeiro, em resposta a estímulos tumorais, que atuam como mensageiros intercelulares (SILVA, 2006). As citocinas estão associadas tanto à perda de tecido adiposo quanto de músculo esquelético, por promoverem a ativação de fatores de transcrição (ARGILÉS *et al.*, 2014). As células cancerosas liberam fatores tais como fator de mobilização de lípidos e PIF assim como citocinas que estão associadas às respostas inflamatórias, dentre elas, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, TGF- $\beta$ , e IFN- $\gamma$ , que possuem um importante papel na etiologia da caquexia do câncer por ativarem uma complexa cascata de respostas biológicas, responsáveis pela maioria das alterações metabólicas características da síndrome (AOYAGI *et al.*, 2015; POWERS *et al.*, 2016).

Elevados níveis de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$  foram encontrados em pacientes com câncer, e os níveis destas citocinas parecem correlacionar-se com a progressão de alguns tumores e também com a perda muscular (SUZUKI *et al.*, 2013). O TNF- $\alpha$ , aumenta a gliconeogênese, lipólise, proteólise, diminui a síntese de proteínas, lipídios e glicogênio e em concentrações elevadas, pode desencadear a liberação de muitos outros fatores, incluindo IL-1 $\beta$  e IL-6, a partir de macrófagos ou células

endoteliais (AOYAGI *et al.*, 2015; CHOEN *et al.*, 2015; TIJERINA, 2004; VAUGHAN *et al.*, 2013). No estado caquético, as concentrações de IL-1 $\beta$  estão aumentadas e causam efeitos semelhantes ao TNF- $\alpha$ , atuando nos mesmos receptores de membrana. Além da IL-1 $\beta$  induzir anorexia em pacientes caquéticos, por provocar aumento nas concentrações plasmáticas de triptofano e serotonina, causando saciedade precoce e suprimindo a fome, ela induz a produção de IL-6, uma citocina que aumenta a lipólise e contribui para a perda de peso (AOYAGI *et al.*, 2015; TIJERINA, 2004). A IL-6 não afeta o metabolismo dos carboidratos, porém aumenta a síntese hepática de proteínas de fase aguda, que são importantes mediadores inflamatórios, induz lipólise e síntese de ácidos graxos (TIJERINA, 2004).

Outra citocina que possui um papel importante na caquexia do câncer é a IL-10, que tem um papel fisiológico na inibição da expressão e liberação de citocinas pró-inflamatórias, e contribuem para a longevidade através da proteção contra a morte por doença cardiovascular e câncer, e demonstra atividade antitumoral, especificamente em células de câncer de mama (CONROY *et al.*, 2016).

Segundo o estudo de Donatto e colaboradores (2013), a melhoria da qualidade de vida relatada em pacientes com câncer que realizam TR pode estar associada, pelo menos em parte, à sua capacidade de amenizar a inflamação sistêmica. A ação das citocinas pró-inflamatórias na caquexia relaciona-se à inibição do fator de crescimento semelhante à insulina -1 (IGF-1) no músculo esquelético, reduzindo a sinalização a favor de síntese proteica (ARGILÉS *et al.*, 2015; GROUNDS, 2002).

## 5.5. INFLAMAÇÃO E PERDA DE MASSA MUSCULAR

Como visto, a inflamação sistêmica está presente em uma parcela significativa dos pacientes com câncer. O fator de transcrição mais relacionado com expressão aumentada de citocinas pró-inflamatórias é o fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) (SPATE & SCHULZEB, 2004). Embora o NF- $\kappa$ B possa ser ativado por meio dos receptores de TNF- $\alpha$  tipo 1 (TNFR1) ou tipo 2 (TNFR2), os dados existentes indicam o TNFR1 como o principal responsável pela perda de proteína muscular induzida por TNF- $\alpha$  (LLOVERA *et al.*, 1998). As espécies reativas de oxigênio (ERO) parecem funcionar como segundos mensageiros para o TNF- $\alpha$  no músculo esquelético, devido à capacidade de ativar NF- $\kappa$ B (REID; LI, 2001). O NF- $\kappa$ B aumenta a atividade

da via ubiquitina-proteassoma ao estimular a transcrição de genes responsáveis pela síntese de E2 e E3 ligases, acelera a degradação das proteínas musculares e promove fraqueza muscular.

Além de ativar o NF- $\kappa$ B, a inflamação também promove o aumento da produção e liberação de ERO por células inflamatórias ativadas. Essas espécies causam modificações oxidativas em proteínas, o que permite que estas sejam degradadas pelo sistema ubiquitina-proteassoma sem que seja necessário sua ubiquitinação, favorecendo também a proteólise quando a inflamação ocorre no tecido muscular (POWERS *et al.*, 2010).

Estudos demonstraram que o crescimento tumoral está associado à inflamação local promovendo alterações na composição de ácidos graxos musculares (KULAGINA *et al.*, 2012), desencadeando catabolismo e comprometimento de vias anabólicas, o que acarreta em perda de massa muscular (ARGILÉS *et al.*, 2014). Assim, a homeostase do músculo esquelético é prejudicada durante o crescimento tumoral, o que parece ser um evento crítico na caquexia do câncer.

Além de promover a proteólise, a ativação do NF- $\kappa$ B em decorrência da inflamação também prejudica a miogênese, através do aumento da expressão do fator de transcrição YinYang1, que reprime a síntese de genes de diferenciação (alfa actina, creatina quinase, cadeia pesada de miosina IIb) (LI; MALHOTRA; KUMAR, 2008). Com isso, o que se conclui até o momento é que a perda de massa muscular esquelética induzida por citocinas é um processo multifatorial, envolvendo maior degradação proteica e diminuição da regeneração e reparo dos miócitos (TISDALE, 2000).

## 5.6. O TREINAMENTO RESISTIDO

O treinamento resistido é definido como um método de condicionamento, que envolve o uso de diferentes cargas progressivas e a ativação voluntária de grupos músculos esqueléticos específicos contra uma resistência externa (FAIGENBAUM ET AL., 2009; WINETT ; CARPINELLI, 2001).

Estudos realizados nos últimos anos indicam que o treinamento físico é uma estratégia para auxiliar na terapia da caquexia, por atenuar as manifestações dessa síndrome (DONATTO *et al.*, 2013; LIRA *et al.*, 2014). Já foi relatado que o

treinamento físico pode reduzir a perda muscular e/ou a fadiga em pacientes com câncer (JURDANA, 2009). Com relação especificamente ao TR, observou-se que esta modalidade de treinamento reduz a perda de massa muscular ou promove a recuperação da massa muscular perdida, assim como é responsável pela melhoria da função muscular e de uma diversidade de biomarcadores, como densidade mineral óssea, melhora da performance física e da função cardiovascular, em pacientes com câncer (STRASSER *et al.*, 2013). Além disso, esses efeitos do TR associam-se com redução da fadiga e melhora na saúde mental (STRASSER *et al.*, 2013).

Donatto *et al.*, (2013) mostraram que o TR diminui a progressão tumoral em ~10% e melhora o sistema imune, aumentando a atividade de macrófagos e linfócitos e o índice de fagocitose em animais portadores de tumor de Walker 256. Um estudo realizado com roedores Al-majid & McCarthy (2001) demonstraram atenuação na perda muscular associada ao implante de adenocarcinoma de cólon-26 por meio de TR (estimulação elétrica dos membros plantares e dorsais do membro posterior), por meio do aumento da relação massa muscular/ concentração de proteína no músculo extensor longo do hálux. Já foi relatado que o TR é capaz de aumentar a força de membros inferiores, a massa muscular e reduzir a gordura corporal em pacientes com câncer tanto em tratamento adjuvante quanto neoadjuvante (PADILHA *et al.*, 2017).

Em suma, o TR já é indicado como uma intervenção eficaz para aumentar a força muscular e atenuar a perda muscular progressiva, em pacientes com doenças alta incidência de caquexia (GOULD *et al.*, 2013). Entretanto, apesar dos relatos indicando os efeitos positivos do TR, na caquexia do câncer, poucos trabalhos estudaram os mecanismos envolvidos nesse processo.

## **6 MATERIAL E MÉTODOS**

### **6.1. ANIMAIS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL**

Foram utilizados 40 camundongos Swiss machos, pesando aproximadamente 30g, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina (UEL). Os animais foram mantidos durante todo o experimento no Biotério do Centro de Educação Física e Esporte (CEFE) da mesma universidade.

Os animais foram acomodados em gaiolas contendo 5 animais, com ração (Nuvilab CR-1, Nuvital) e água *ad libitum*. Todos os procedimentos foram realizados após aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Londrina, registrado sob o processo CEUA nº 28336.2014.38 e seguiram as recomendações do Conselho Nacional de Experimentação Animal.

Após uma semana de adaptação ao biotério de experimentação do CEFU-UEL, os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos, sendo eles: grupo controle (C=10), grupo inoculado com células tumorais (T=10), grupo exercitado (E=10) e grupo inoculado com células tumorais e exercitado (TE=10). As células tumorais ( $1 \times 10^6 / 100 \mu\text{L}$  de solução salina) foram inoculadas subcutaneamente no flanco direito, dois dias antes do início do TR nos grupos T e TE. Os animais do grupo E e TE foram submetidos ao TR por 4 semanas, enquanto os animais do grupo C e T permaneceram sedentários durante todo o experimento. Ao final de 4 semanas completos de TR, os animais foram eutanasiados (Figura 2).



**Figura 2.** Esquema do delineamento experimental, realizado por um período de 4 semanas. Os animais dos grupos T e TE foram inoculados com células tumorais, posteriormente todos os grupos foram submetidos ao teste de carga máxima e durante 4 semanas os animais do grupo E e TE realizaram o treinamento. Após o término do período de treino (4 semanas), os animais de todos os grupos realizaram o teste de carga máxima novamente.

## 6.2. MANUTENÇÃO E INOCULAÇÃO DO TUMOR

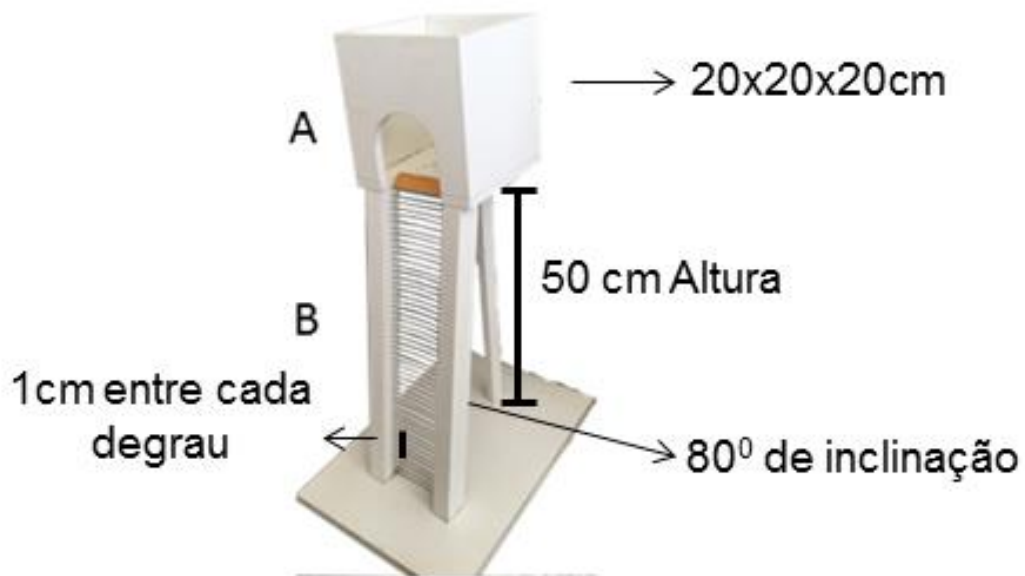
Nos animais dos grupos T e TE foram inoculadas células tumorais de carcinoma mamário de Ehrlich, mantidas na forma de tumor ascítico através de repiques intraperitoneais seriados. Para a inoculação dos grupos experimentais, o conteúdo ascítico (2 mL) foi puncionado da cavidade peritoneal de camundongos após 10-28 dias de inoculação. As células do fluido ascítico foram lavadas em tampão fosfato (PBS, pH 7.4), centrifugadas (200g, 10min/4°C), e lavadas três vezes em PBS (FRAJACOMO *et al.*, 2016). As células de Ehrlich foram diluídas na concentração final de  $1 \times 10^6/100 \mu\text{L}$  de solução salina. A inoculação do conteúdo celular ocorreu (dia 0) na região subcutânea do flanco direito. Os animais controle receberam 100  $\mu\text{L}$  de PBS. A espessura do tumor foi mensurada ( $\text{mm}^3$ ) ao longo das 4 semanas (duas vezes por semana), com paquímetro digital 6" (Sagyma Plus), tal medida foi realizada por meio do diâmetro maior (D) e diâmetro menor (d). Para a obtenção do volume tumoral, foi utilizada a seguinte fórmula:  $V=1/2*(D*(d)^2)$  (GOTO *et al.*, 2000).

### 6.3. TESTE DE CARGA MÁXIMA

O teste de carga máxima foi realizado na escada (Figura 3, descrição no próximo tópico), por todos os grupos (C,T,E e TE), antes e logo após as 4 semanas de treinamento. Para determinação da carga máxima para o treinamento, os animais realizaram inderterminados números de subidas na escada, sendo a primeira subida com sobrecarga de 50% do peso corporal do animal atado à cauda, seguido de mais 4 subidas subsequentes com sobrecarga progressiva correspondente à 75, 90, 95 e 100% do peso corporal do animal. Caso o animal chegasse a esse estágio, eram adicionados mais 3,0g a cada subida realizada, até a falha do animal, ou seja, subida incompleta. Para a determinação da carga máxima ao final das 4 semanas de treinamento, os animais realizaram as subidas com as porcentagens citadas acima, porém, em relação à última carga do último treino nos grupos E e TE. Para os grupos C e T, foi utilizada a carga máxima alcançada no primeiro teste para a realização da carga máxima após as 4 semanas de treinamento. A capacidade de carregar a carga máxima alcançada foi utilizada como parâmetro de força muscular.

#### 6.4. PROTOCOLO DE TREINAMENTO RESISTIDO

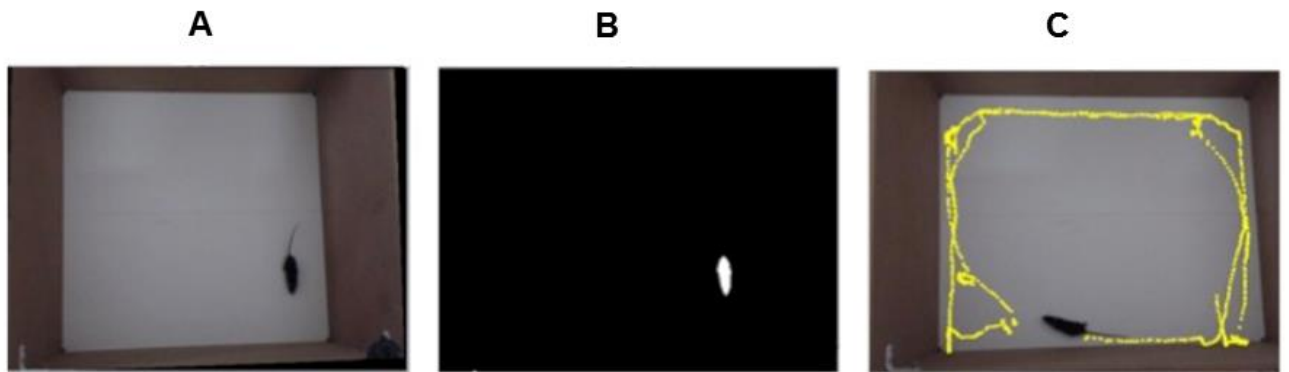
O TR consistiu de uma série de escaladas em aparato em formato de escada construída com 50 cm de altura, 1 cm entre os degraus, 80 graus de inclinação (Figura 3). Tais dimensões permitiram que os animais realizassem de 8 a 10 movimentos de escalada completos a cada subida. No topo da escada havia uma área escura (20x20x20cm) para a recuperação após a subida (adaptado de HORNBERGER; FARRAR, 2004). Os animais realizaram 5-8 subidas completas no aparato, com dois minutos de repouso entre elas. No primeiro dia de TR, as subidas foram iniciadas com sobrecarga de 50% da última sobrecarga alcançada no teste de carga máxima, seguido de mais 4 subidas subsequentes com sobrecarga progressiva correspondente à 75, 90, 95 e 100% da sobrecarga que o animal atingiu no teste de carga máxima. Uma vez completadas as 5 subidas, os animais foram submetidos a mais 3 subidas (totalizando 8) com incremento de 3,0g de peso progressivamente (HORNBERGER; FARRAR, 2004). O treino foi interrompido quando o animal completou 8 subidas com sucesso ou até a falha caracterizada pela subida não completada por 3 tentativas seguidas. O peso carregado na última tentativa de escalada com sucesso foi considerado como carga máxima da sessão de treino. A carga máxima de cada sessão de treino foi utilizada para ajustar a carga de treinamento subsequente dos animais dos grupos E e TE. Assim, as sessões de treino subsequentes a primeira, utilizavam 50, 75, 90, 95 e 100% da carga máxima alcançada na última sessão, atado à cauda do animal. O procedimento para o acréscimo de cargas após a 5ª subida completa e interrupção de treino foi utilizado em todas as sessões de TR. O TR foi realizado 3 vezes por semana com intervalo mínimo de 48 horas entre as sessões, para um total de 4 semanas. Os animais dos grupos C e T não foram submetidos ao TR.



**Figura 3.** Imagem ilustrativa da escada de treinamento resistido utilizada para o treinamento dos animais, em (A) câmara de descanso e em (B) degraus da escada.

#### 6.5. TESTE DE CAMPO ABERTO (OPEN FIELD TEST)

O teste de campo aberto possui como objetivo determinar o deslocamento dos animais expostos a um campo novo e inexplorado de 50x50cm de tamanho por período de 5 minutos. A distância percorrida e o número total de cruzamentos no centro do campo foram utilizados como parâmetros de capacidade locomotora e de exploração, respectivamente (PRUT; BELZUNG, 2003). Uma câmera digital (Longitech, modelo c920, 30Hz) foi utilizada para capturar imagens do campo para a detecção dos movimentos do animal (Figura 4A). As imagens foram adquiridas utilizando o *software* Dvídeo que permite calcular o movimento do animal na área de teste por meio de um sistema bidimensional de coordenadas baseadas no método Direct Linear Transformation (DLT), proposto por Yi & Hm (1971). A trajetória capturada de cada camundongo foi processada por um filtro digital *Butterworth* de frequência de corte de 1Hz. A distância percorrida foi obtida pelo deslocamento adquirido entre cada imagem consecutiva. O teste foi realizado na última semana de experimento, com todos os animais.



**Figura 4.** Imagens ilustrativas do processamento dos dados. Imagem da câmera digital (Longitech, modelo c920, 30Hz (A), resultado do processo de segmentação (B), resultado do processo de rastreamento (C).

#### 6.6. TESTE ROTAROD

Para verificação da performance motora dos animais, foi realizado o teste rotarod (VALÉRIO *et al.*, 2007). O aparelho eletrônico consiste em uma caixa, com aberturas frontal e superior, em seu interior há uma barra fixada (25 cm) nas laterais da caixa com 2,5 cm de diâmetro, além de 5 placas dividindo-a em 6 compartimentos, porém somente 4 são utilizáveis devido ao monitor que ilustra digitalmente o tempo em que o animal permanece sobre a barra, assim que o animal cai sobre a paleta fixa na região inferior da caixa, o cronômetro pausa no mesmo instante (Ugo Basile, Modelo 7600) (Figura 5). Durante a realização do teste, a velocidade de giro da barra foi de 33 rotações por minuto, para a análise da performance motora foi considerado o tempo de permanência do animal sobre a barra. O teste foi realizado na última semana de experimento, com todos os animais.



**Figura 5.** Imagem ilustrativa do equipamento rotarod.

#### 6.7. EUTANÁSIA, COLETA E PREPARO DOS TECIDOS

Setenta e duas horas após a última sessão de TR, todos os animais foram submetidos à anestesia com injeção intraperitoneal de ketamina/xilazina (5:1, 0.1ml/20g peso corporal). O sangue foi coletado por punção cardíaca, centrifugado, o plasma separado e armazenado à -80°C para posteriores análises bioquímicas. Os músculos EDL, sóleo e gastrocnêmio foram retirados da pata contralateral à inoculação tumoral, pesados e uma porção foi fixada em paraformaldeído a 4% para análise histológica e morfométrica. O restante do músculo gastrocnêmio foi utilizado para análises de expressão gênica e expressão proteica. O baço foi retirado, pesado e fixado em paraformaldeído a 4% para análise histológica. O fígado e a gordura retroperitoneal foram retirados, pesados, e posteriormente descartados. A gordura retroperitoneal foi utilizada como parâmetro de gordura corporal. O tumor foi cuidadosamente retirado, dissecado, pesado, e uma porção fixada em paraformaldeído a 4% para análises histológicas.

#### 6.8. ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA DAS FIBRAS MUSCULARES

Uma porção dos músculos sóleo, EDL e gastrocnêmio foram fixadas em paraformaldeído 4% por 24h, posteriormente desidratada com banhos de etanol para inclusão em parafina, de acordo com os procedimentos descritos por Fonseca *et al.* (2012). O tecido foi cortado em espessura de 5µm (5 cortes/lâmina) de forma semi-seriada (com distância de 5 cortes (25 µm entre cada um) e posteriormente corados com hematoxilina e eosina, analisados e fotografados utilizando microscópio de luz (Olympus®) com câmera acoplada com aumento de 200x. A quantificação da área de secção transversa (ASTr) de cada fibra foi realizada através dos programas Image J e Image-Pro Plus® 23 4.5 (Media Cybernetics, Rockville, EUA).

#### 6.9. CITOCINAS PLASMÁTICAS

As citocinas TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 foram determinadas no plasma por ELISA através do kit da Affymetrix eBioscience®, (San Diego, USA), seguindo as recomendações do fabricante. A concentração foi determinada por espectrofotômetro para microplacas Epoch (BioTek Instruments, USA).

#### 6.10. ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA DO BAÇO

As amostras do baço fixadas e emblocadas em parafina assim como descrito para o músculo gastrocnêmio, foram cortadas em espessura de 5µm (5 cortes/lâmina) de forma semi-seriada (com distância de 5 cortes (25 µm entre cada um) e posteriormente corados com hematoxilina e eosina, analisados e fotografados utilizando microscópio de luz (Olympus®) com câmera acoplada e aumento de 5x. Foi analisada a área ocupada pela polpa branca em relação à área total da foto através dos programas Image J e Image-Pro Plus® 23 4.5 (Media Cybernetics, Rockville, EUA).

### 6.11. QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA MUSCULAR – RT-PCR

Para determinação da expressão gênica, o RNAm total foi isolado a partir de 80 mg de músculo gastrocnêmio congelado usando Kit RiboPure (Ambion, número PM 1924, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. O RNA total foi quantificado por espectrofotômetro a 260/280 nm (NanoDrop2000c, EUA). Foi avaliada a qualidade e a integridade do RNA isolado utilizando gel de agarose (1,2%). O cDNA foi sintetizado a partir de 1000 ng de RNAm total, utilizando o Kit de alta capacidade de Transcrição Reversa cDNA (Applied Biosystems, número 4.374.966, EUA). PCR quantitativo em tempo real foi realizado usando o sistema 7500 fast RT-PCR (Applied Biosystems, EUA). Os seguintes ensaios de expressão de genes Taqman® (Applied Biosystems, EUA) foram usados neste estudo: FOXO1, FOXO3, Atorquin-1 e PGC-1 $\alpha$ . Os ciclos de PCR foram os seguintes: um ciclo de 50°C durante 2 minutos, um ciclo de 95°C durante 20 segundos, 40 ciclos de 01 segundo a 95°C, 20 segundos a 60°C. Cada ensaio de PCR foi realizado em triplicata. Como gene de referência foi utilizado beta actina para normalizar as reações. A quantificação relativa foi determinada pelo método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (RIBEIRO *et al.*, 2018).

### 6.12. IMUNOBLOTTING

Para análise da quantidade de proteína, o músculo gastrocnêmio (100mg/1ml de tampão) foi homogeneizado em tampão de extração contendo 50mM HEPES, 40mM NaCl, 2mM EDTA, 1,5mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 50mM NaF, 10mM de sódio pirofosfato, 10mM de sódio betaglicerolfosfato, 1% Triton-X 100 e um coquetel inibidor de protease. Após a quantificação de proteínas totais, as amostras foram separadas em um gel de agarose a 10% e transferidas para uma membrana de PVDF (Bio-Rad, Immun-Blot®), bloqueadas com leite 5% e incubadas com anticorpos primários e secundários, como descrito (MAGDALON *et al.*, 2016) para FBXO32 e MURF-1. A densidade das bandas foi obtida com o software Image J. Para a normalização dos resultados foi utilizada a proteína GAPDH.

### 6.13. HISTOLOGIA E IMUNOHISTOQUÍMICA DO TUMOR PARA MEDIDA DE AGRESSIVIDADE TUMORAL

As amostras do tumor foram fixadas e emblocadas em parafina assim como descrito para o músculo gastrocnêmio. O tecido tumoral foi cortado transversalmente e corado pela técnica de *Sirius red* para quantificação de tecido conjuntivo e medidas do tamanho da cápsula tumoral. Esses procedimentos foram realizados utilizando o programa Image J após a aquisição das imagens (aumento de 200 vezes para a região central do tumor e aumento de 100 vezes para observação da cápsula) utilizando microscópio de luz (Olympus®) com câmera acoplada.

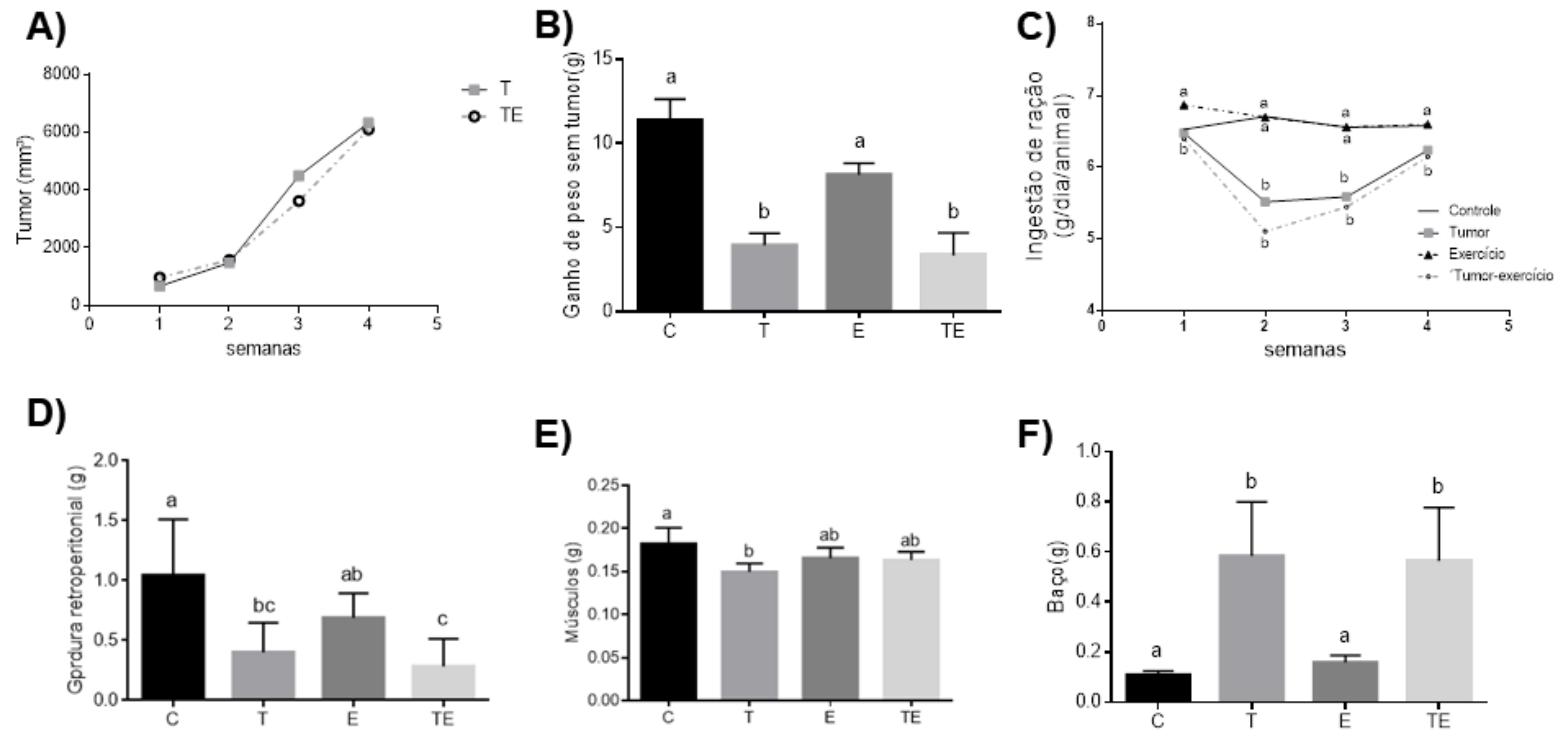
O tecido tumoral foi também utilizado para imunohistoquímica testando positividade do antígeno de proliferação celular Ki67 de acordo com o protocolo de Besusso, *et al* (2013). A quantidade de área marcada foi calculada por meio de imagens representativas (aumento 200x) utilizando o programa Image J. A apoptose das células tumorais foi investigada pelo teste de *terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling assay* (TUNEL), através de kit comercialmente disponível (TREVIGEN, TACS® 2 TdT- DAB In Situ Apoptoses Detection Kit), seguindo as recomendações do fabricante. A quantificação da área marcada, correspondente à extensão da apoptose foi determinada com o auxílio do programa Image J.

## 7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O teste de Rout foi utilizado para identificação de *outliers*, seguido pela verificação da normalidade dos dados, por meio dos testes de Shapiro-Wilk e D'Agostino-Pearson. Os testes utilizados foram *Two-way ANOVA*, *One-way ANOVA* seguido de *post-test* de Tukey. O teste *t* de *student* foi utilizado para os dados paramétricos. Quando não paramétricos, as diferenças entre os grupos foram investigadas pelo teste de Mann-Whitney (análise da cápsula tumoral) ou Kruskal Wallis com *post-hoc* de Dunn (ASTr). Os resultados foram apresentados em média  $\pm$  desvio padrão, exceto o gráfico de dispersão que foi apresentado em mediana e considerados significativos quando  $P < 0,05$ . O programa GraphPad Prism 5 foi utilizado para as análises estatísticas.

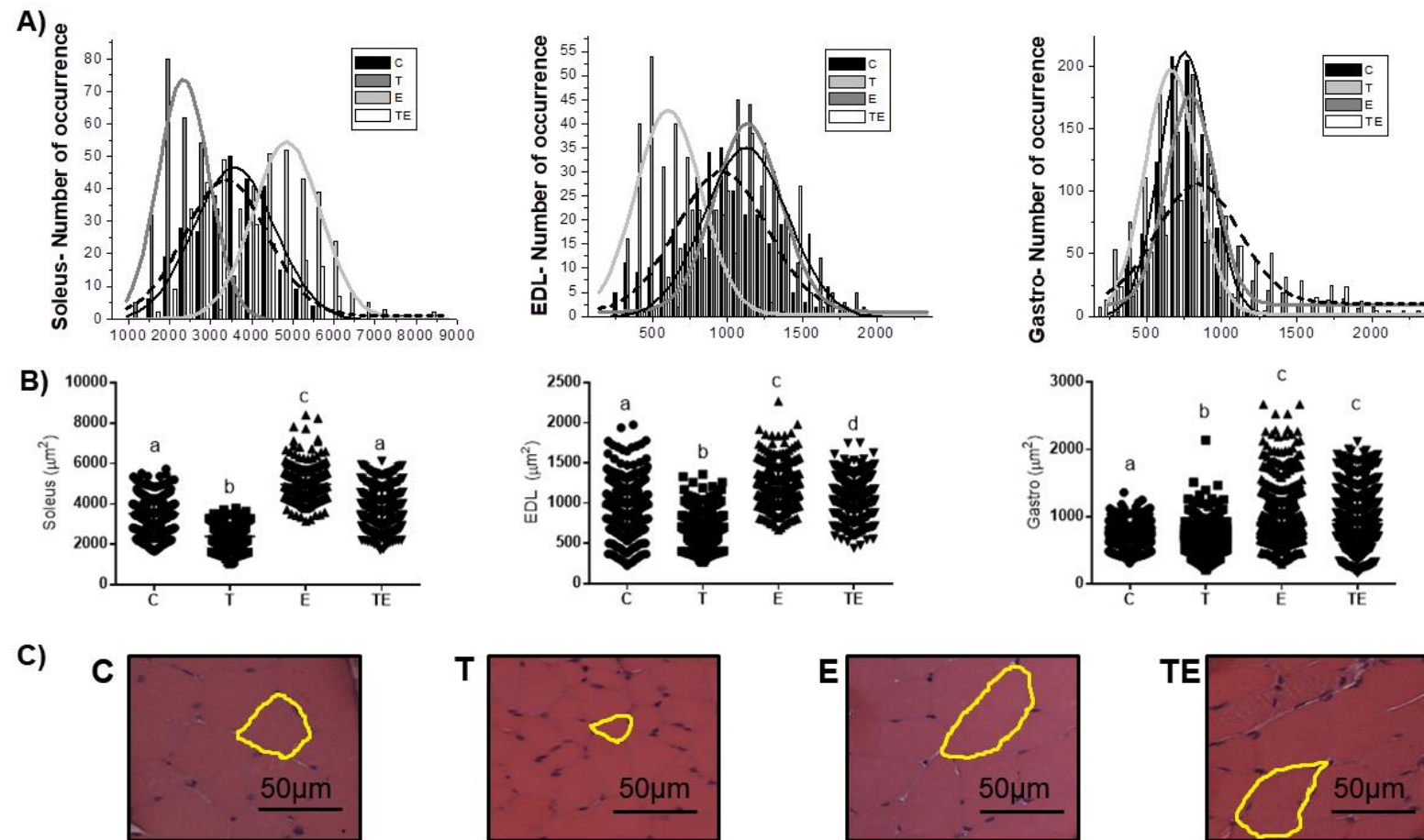
## 8 RESULTADOS

A figura 6 apresenta as características gerais dos grupos estudados. O tumor de Ehrlich cresceu progressivamente da primeira até a última semana (Figura 6A), alcançando 19% do peso corporal total dos animais após 4 semanas de inoculação. O crescimento do tumor promoveu redução do ganho de peso corporal (65% comparado com o controle) (Figura 6B), anorexia (16%), com diminuição da ingestão de ração durante a segunda e terceira semana (Figura 6C), além de reduzir a massa de gordura retroperitoneal (61%, figura 6D) e a massa muscular (15%, figura 6E). O crescimento do tumor promoveu ainda, aumento do peso do baço (435%, figura 6F). O TR não foi capaz de reduzir o tamanho do tumor (6A), amenizar a perda de peso (Figura 6B), reverter a anorexia (6B), a perda de gordura (6D), de massa muscular (6E) e do baço (6F).



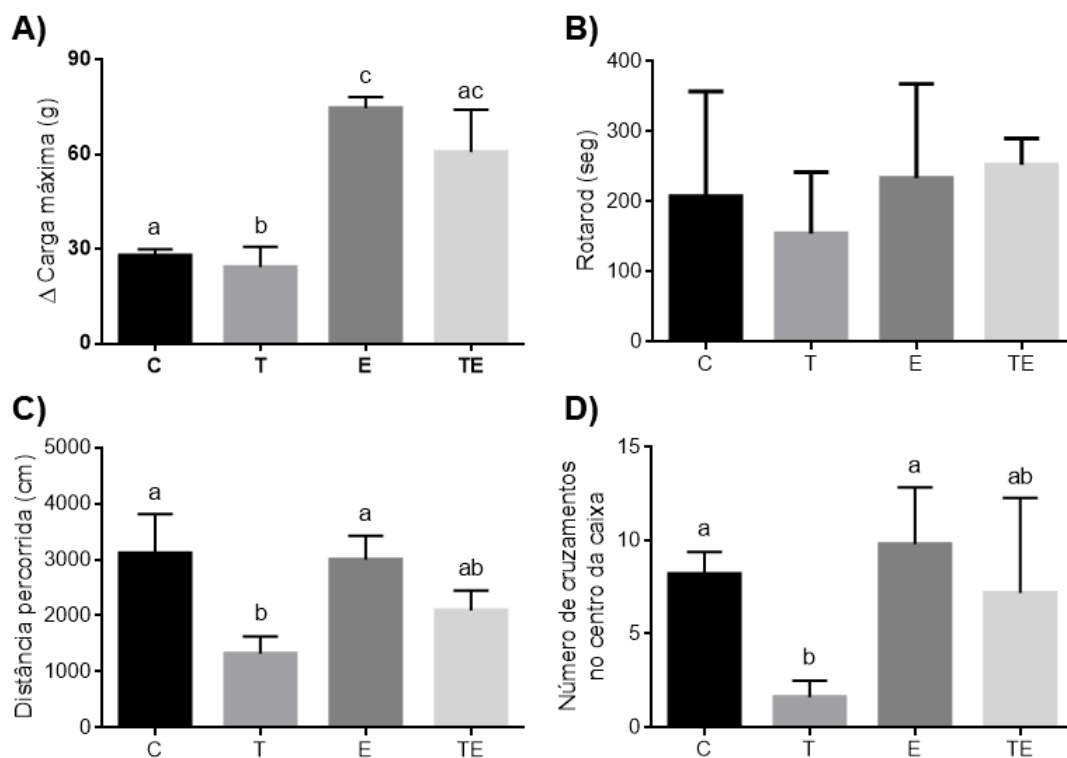
**Figura 6. Volume tumoral (A), ganho de peso sem tumor (B), ingestão de ração (C) gordura retroperitoneal (D), músculos (E) e baço (F) em camundongos controle (C), portadores da forma sólida do tumor Ehrlich (T), exercitados (E) e portadores da forma sólida do tumor Ehrlich e exercitados (TE). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão,  $P < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo. Letras diferentes, diferem estatisticamente).**

A figura 7 apresenta os valores de ASTr do músculo sóleo, EDL e gastrocnêmio. Os resultados demonstram que a inoculação com células tumorais causou redução significativa ( $P < 0,05$ ) de 59% na ASTr do músculo sóleo, 54% do músculo EDL e 28% do músculo gastrocnêmico (Figura 7A;B). Em contrapartida, o TR preveniu a atrofia desses músculos (EDL - 172%, sóleo - 157% e gastrocnêmio - 80%;  $P < 0,05$ ) induzida pelo crescimento do tumor (Figura 7A;B) (TE vs T).



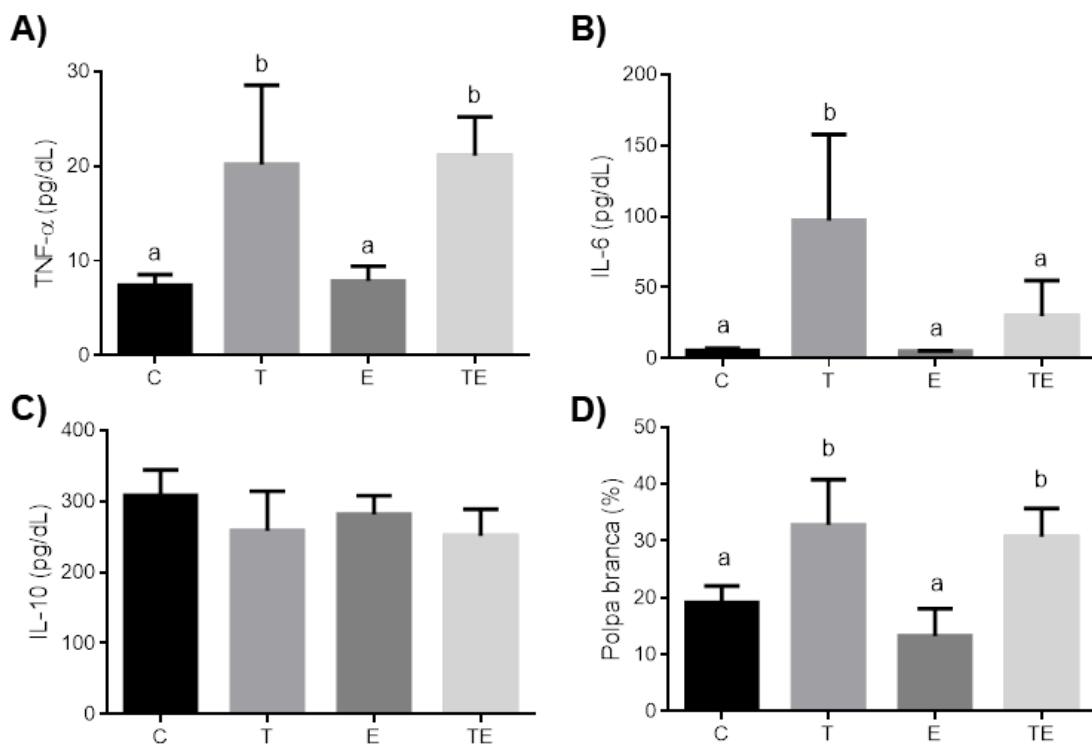
**Figura 7.** Análise da área de secção transversa dos músculos sóleo, EDL e gastrocnêmio após coloração com hematoxilina e eosina (HE). % da ocorrência de fibras com diferentes tamanhos nos grupos C, T, E, TE (A), distribuição de áreas analisadas (μm<sup>2</sup>) (B) e imagens ilustrativas da área de secção transversa do músculo gastrocnêmio (C). P<0,05 foi considerado estatisticamente significativo. Letras diferentes, diferem estatisticamente. Controle (C), tumor (T), exercício (E) e tumor-exercício (TE).

O crescimento tumoral diminuiu a carga máxima suportada pelos animais (23%;  $P < 0,05$ ) comparado ao grupo controle, como evidenciado através da diferença da carga máxima obtida no teste final (após 4 semanas de período experimental) e da carga máxima inicial ( $\Delta$  Carga máxima) (Figura 8A). A capacidade locomotora e exploratória realizados no teste de campo aberto, também foi menor no grupo T (57% e 80%, respectivamente;  $P < 0,05$ ) (Figura 8C e 8D) quando comparado ao grupo C. O TR preveniu a perda da força do animais com tumor (200%,  $P < 0,05$ ) quando comparados ao grupo tumor (Figura 8A) e melhorou a distância percorrida e no número de cruzamentos na caixa, visto que não foi estatisticamente diferente do grupo exercício (Figura 8C;D). Não houve diferença estatística no teste rotarod, onde verificou-se o tempo de permanência dos animais no equipamento (Figura 8B).



**Figura 8.** Variação da carga máxima (A), rotarod (B), distância percorrida (C) e número de cruzamentos no centro da caixa (B) após 4 semanas em camundongos controle (C), portadores da forma sólida do tumor Ehrlich (T), exercitados (E) e portadores da forma sólida do tumor Ehrlich e exercitados (TE). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão,  $P < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo. Letras diferentes, diferem estatisticamente.

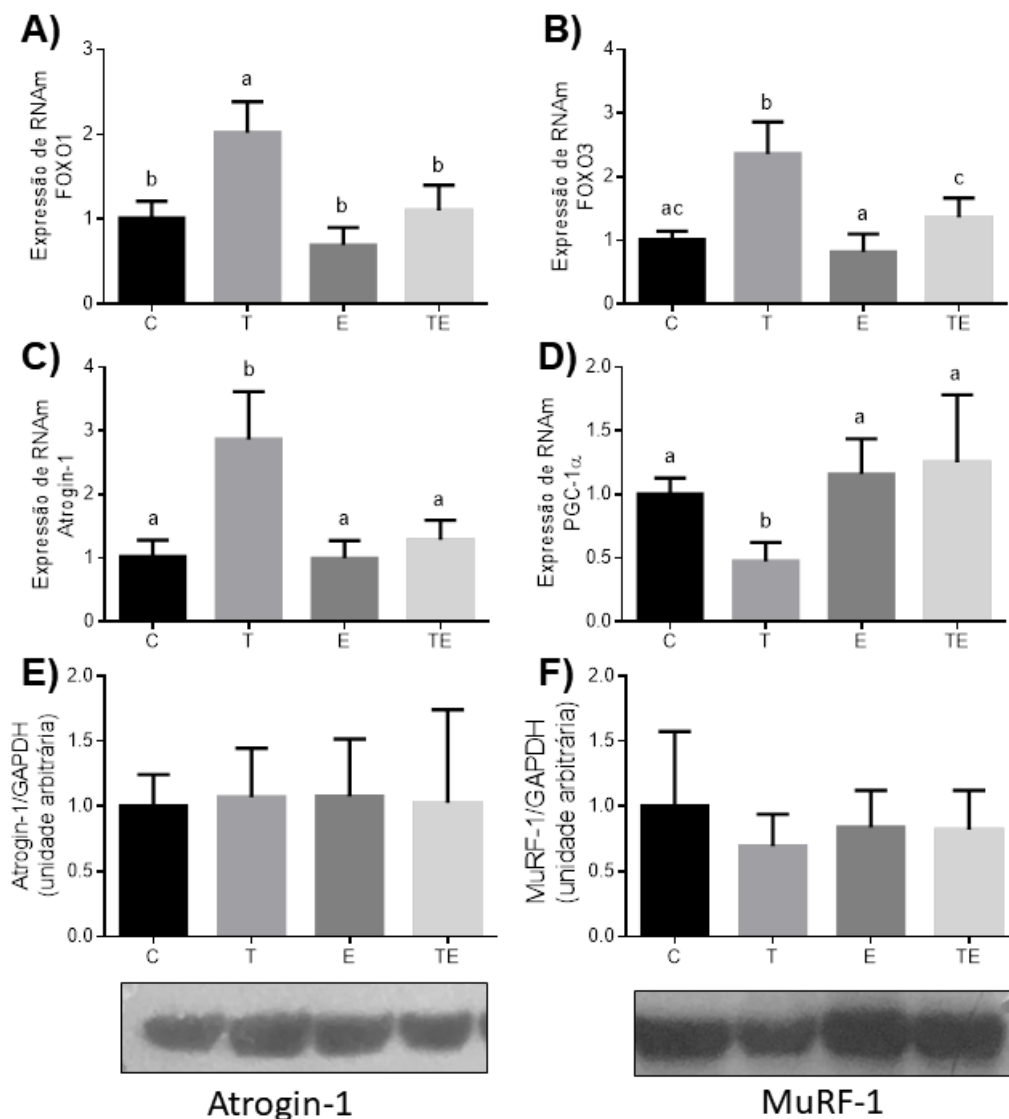
Na figura 9 estão apresentadas os níveis de citocinas circulantes para todos os grupos experimentais, assim como a análise da polpa branca do baço. O crescimento do tumor promoveu aumento significativo ( $P < 0,05$ ) dos níveis de TNF- $\alpha$  (224%) e de IL-6 (1635%) plasmáticos (Figura 9A e 9B, respectivamente), porém não houve diferença estatística na análise dos níveis de IL-10 (Figura 9C). O baço foi analisado histologicamente devido ao aumento em seu tamanho, para isso, foi analisado a % de polpa branca em relação à área total da foto e foi encontrado que o crescimento do tumor promoveu aumento de (71%;  $P < 0,05$ ) (Figura 9D). O TR não foi capaz de reduzir o TNF- $\alpha$  induzido pelo crescimento do tumor (Figura 9A), entretanto preveniu o aumento de IL-6 (69%  $P < 0,05$ ) (Figura 9B) e não alterou os níveis de IL-10 plasmáticos (Figura 9C) e a % de polpa branca (Figura 9D).



**Figura 9.** Marcadores pró-inflamatórios sistêmicos: TNF- $\alpha$  (A), IL-6 (B), marcador anti-inflamatório sistêmico: IL-10 (C) e análise da polpa branca do baço (D) após 4 semanas em camundongos controle (C), portadores da forma sólida do tumor Ehrlich (T), exercitados (E) e portadores da forma sólida do tumor Ehrlich e exercitados (TE) Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão,  $P < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo. Letras diferentes, diferem estatisticamente.

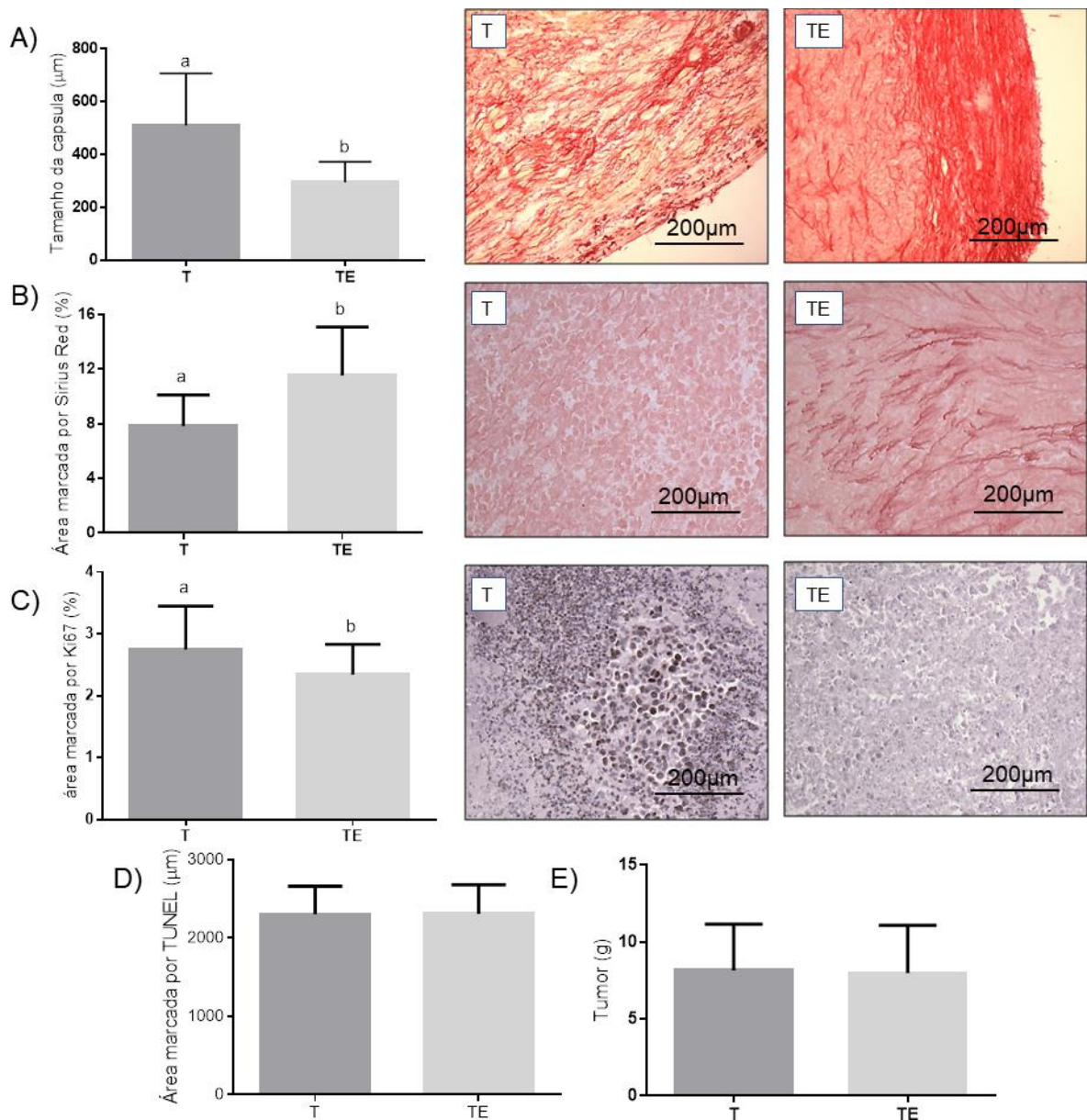
A análise de expressão gênica no músculo gastrocnêmio revelou aumento significativo ( $P < 0,05$ ) na quantidade de RNAm de FOXO1 (Figura 10A; 99%), FOXO3 (Figura 10B; 134%), Atrogin-1 (Figura 10C; 179%) no grupo T quando

comparado ao grupo C. O grupo T também apresentou menores valores (53%;  $P < 0,05$ ) de RNAm PGC-1 $\alpha$  (Figura 10D), quando comparado ao controle. Por outro lado, o TR reduziu a expressão dos genes FOXO1 (Figura 10A), FOXO3 (Figura 10A) e Atrogin-1 (Figura 10A) (respectivamente, 45%, 42% e 55%;  $P < 0,05$ ), além de aumentar a expressão gênica de PGC-1-  $\alpha$  (Figura 10A) (163%,  $P < 0,05$ ) (TE vs T). Na análise das proteínas Atrogin-1 (Figura 10E) e MuRF-1 (Figura 10F), realizadas no músculo gastrocnêmio, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos.



**Figura 10.** Expressão gênica muscular analisada por RT-PCR das proteínas FOXO1 (A), FOXO3 (B), Atrogin-1 (C) e PGC-1 $\alpha$  (D). Análise das proteínas musculares Atrogin-1 (E) e MuRF-1 (F) pela técnica de Western Blotting após 4 semanas em camundongos controle (C), portadores da forma sólida do tumor Ehrlich (T), exercitados (E) e portadores da forma sólida do tumor Ehrlich e exercitados (TE) Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão.  $P < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo. Letras diferentes, diferem estatisticamente.

A massa final do tumor (~8g) atingiu 19% da massa corporal final dos animais, não havendo diferença estatística entre os grupos (Figura 11E). A análise histológica demonstrou redução significativa ( $P < 0,05$ ) (51%) do tamanho da cápsula tumoral e aumento significativo ( $P < 0,05$ ) (47%) da área de fibrose central no grupo TE com relação ao T (Figuras 11A e B). Além disso, o TR reduziu significativamente ( $P < 0,05$ ) 10% a proliferação das células tumorais comparado com animais do grupo T (Figura 11C); apesar de não alterar a apoptose das células tumorais quantificada pelo teste de TUNEL (Figura 11D).



**Figura 11.** Tamanho da cápsula tumoral (A) grupo T, TE; % de área central tumoral marcada com cor vermelha Sirius (B) grupo T, TE; % de área tumoral marcada pelo antígeno Ki67 (C) grupo T, TE;

quantificação da apoptose (D), realizado pela técnica de TUNEL, peso do tumor (g) (E) após 4 semanas em camundongos portadores da forma sólida do tumor Ehrlich (T) e portadores da forma sólida do tumor Ehrlich e exercitados (TE) Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão.  $P < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo. Letras diferentes, diferem estatisticamente.

## 9 DISCUSSÃO

Os principais resultados do presente estudo foram: 1) O TR previne a atrofia e perda de força muscular induzida pelo crescimento do tumor de Ehrlich, ainda que não tenha prevenido a perda de massa corporal; 2) tal efeito preventivo pode estar associado à diminuição nos níveis sistêmicos de IL-6 que provavelmente inibe a superexpressão de genes-chave para a degradação de proteínas musculares. 3) O TR foi ainda capaz de reduzir parâmetros de agressividade tumoral como diminuição da proliferação e aumento da deposição de colágeno, ainda que não tenha inibido o crescimento do tumor

O TR é o principal tipo de exercício eficiente em aumentar a força muscular e a hipertrofia em humanos (LASEVICIUS *et al.*, 2018). A hipertrofia muscular causada pela prática de exercício resistido ocorre devido ao aumento na área de secção transversa das fibras musculares e no número de sarcômeros, decorrente do aumento na síntese proteica (SECCHI *et al.*, 2008). Entretanto, o crescimento tumoral promove um ambiente desafiador para o tecido muscular na tentativa de manter o balanço entre a síntese e a degradação de proteínas; o TR pode agir de forma diferente em organismos com e sem tumores. O crescimento tumoral promove a geração de radicais livres e superexpressa vias inflamatórias crônicas, desregulando o balanço de síntese e degradação protéica no músculo esquelético que está relacionada à atrofia muscular. A resposta inflamatória acompanha o desenvolvimento da caquexia e vem sendo apontada como um fator diretamente responsável pela perda de massa muscular observada na síndrome, uma vez que TNF- $\alpha$  e IL-6 são capazes de aumentar a expressão de genes que codificam componentes fundamentais na indução de proteólise muscular (SPATE & SCHULZE, 2004). Li *et al.*, 2009, demonstraram que as respostas transcricionais às citocinas pró-inflamatórias desencadeiam a expressão de genes envolvidos na via de degradação da proteína ubiquitina-proteassoma, levando à atrofia muscular, duas E3 ligases, atrogin-1 e MuRF-1, respondem à citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$ . A atrogin-1 e MuRF-1, identificadas há mais de 10 anos, são duas E3 ligases específicas do músculo que estão aumentadas no músculo esquelético sob condições de atrofia. No caso da atrogin-1, a supressão ou inibição completa de sua expressão resulta na preservação muscular em diversos modelos de atrofia. (BODINE & BAEHR, 2014). Yuan *et al.*, (2015) analisando a expressão de atrogin-1

e MuRF-1 no músculo esquelético durante a caquexia do câncer *in vitro* e *in vivo*, demonstraram que a expressão gênica de atrogin-1 e MuRF-1 tendem a estar aumentadas no músculo esquelético de pacientes com doença maligna antes mesmo da perda de peso, além disso, quatro genes associados à via ubiquitina proteassoma (atrogin-1, MuRF-1, ubiquitina e E2-14K) foram superexpressos nos camundongos portadores de tumor associado à caquexia do câncer (YUAN *et al.*, 2015).

Visto que o TR preveniu a atrofia muscular e diminuiu os níveis citocina pró-inflamatória IL-6, analisamos genes importantes na sinalização para a atrofia muscular. O TR promoveu diminuição da expressão de RNAm para proteínas importantes para a atrofia muscular como, FOXO1, FOXO3 e atrogin-1, além de um aumento da expressão de RNAm da proteína PGC-1 $\alpha$ , importante marcador de biogênese mitocondrial. Em doenças onde o catabolismo encontra-se aumentado, como o câncer, geralmente há uma diminuição na via de sinalização PI3K-AKT-mTOR, resultando na diminuição de síntese proteica, podendo haver aumento da proteólise, através da expressão mediada por FOXO pertencente aos fatores de transcrição e atrofia (CHOEN *et al.*, 2015). A ativação somente de FOXO3 já seria suficiente para desencadear proteólise por meio de ativação do SUP e autofagia, causando atrofia. (CHOEN *et al.*, 2015; SANDRI *et al.*, 2006). A expressão de atrogin-1 e MuRF-1, ligases do SUP, é causada pela ativação de FOXO3, e estão relacionadas com a atrofia e grande perda de massa muscular (SANDRI *et al.*, 2006). Neste trabalho foi encontrado diminuição da expressão de RNAm de FOXO3, promovida pelo TR, entretanto, não houve diferença na análise da expressão proteica de atrogin-1 e MuRF-1. O PGC-1 $\alpha$  desempenha um papel fundamental na preservação da massa muscular esquelética, do conteúdo mitocondrial e no metabolismo oxidativo, em condições atróficas (ARANY, 2008), além de poder ser um importante mediador do exercício e da atividade de moto neurônios no músculo esquelético (SANDRI *et al.*, 2006). Neste trabalho, o TR foi capaz de aumentar a expressão de RNAm de PGC-1  $\alpha$ . Além disso, já foi relatado que o estado catabólico de doenças como câncer, sepse e insuficiência renal, inibem a expressão de PGC-1  $\alpha$  no músculo esquelético de animais (SANDRI *et al.*, 2006), ressaltando seu papel protetor na massa muscular esquelética.

Assim, nossos resultados confirmam nossa hipótese de que em condições severas de desbalanço entre a síntese e a degradação de proteínas, como o

imposto pelo câncer, o efeito anti-atrófico do TR está associado não somente a sua capacidade de estimular via de síntese, mas também de inibir a superexpressão de moléculas ativadoras da degradação de proteínas no músculo esquelético. Um estudo do nosso grupo já havia demonstrado que os efeitos antiinflamatórios promovidos por TR (PADILHA *et al.*, 2017) desempenham um papel importante na regulação negativa da degradação de proteínas induzida pelo crescimento de tumores em ratos. Nosso estudo demonstrou que o TR protegeu a massa muscular nos animais com tumor devido aos seus efeitos na inflamação sistêmica, uma vez que atenuou a elevação de IL-6 induzida pelo crescimento tumoral. Já foi descrito que o TR é capaz de diminuir significativamente a produção de TNF- $\alpha$  e aumentar a produção de IL-10 em ratos portadores de tumor de Walker-256 (DONATTO *et al.*, 2013). Segundo Donatto *et al.* (2013), essa alteração acontece predominantemente na produção dessas citocinas pelo tecido adiposo dos animais. No presente estudo, os efeitos do TR foram predominantemente observados na IL-6, uma vez que o aumento do TNF- $\alpha$  e da porcentagem da polpa branca do baço não foram prevenidos pelo TR. A análise do baço também foi feita porque apesar do tecido muscular ser o mais afetado pela caquexia, sabe-se que outros órgãos também podem ser atingidos. Isso acontece porque o tecido tumoral apresenta altas taxas de proliferação celular e elevada demanda energética, contrastando com o estado catabólico predominante nos pacientes caquéticos, promovendo um balanço energético negativo capaz de promover desordens metabólicas sistêmicas (PORPORATO, 2016). Os animais com tumor apresentaram aumento significativo na massa do baço. Embora a esplenomegalia já tenha sido observada na caquexia (AULINO *et al.*, 2010; PIEGARI *et al.*, 2011), sua causa pode ter origens diversas, pode representar uma hiperplasia imune, hematopoese extramedular, mas também pode refletir uma hipertensão portal secundária à falência hepática e à obstrução venosa por infiltração de células neoplásicas, como acontece no câncer metastático (ZIMMERS *et al.*, 2016). O protocolo de TR utilizado nesse trabalho não foi capaz de reverter significativamente a perda de massa corporal nos animais. Provavelmente isso tenha acontecido porque o exercício não foi capaz de impedir o crescimento do tumor e a degradação do tecido adiposo. Além disso, o TR também não impediu o aumento do baço.

O exercício físico pode ser de grande importância para pacientes com câncer avançado, em estágio caquético, devido aos seus efeitos benéficos na força

e massa muscular (ARGILÉS *et al.*, 2012). O nosso trabalho demonstrou que além de prevenir a atrofia, o TR foi capaz de aumentar a força muscular nos animais com tumor. O aumento da força muscular é muito importante uma vez que a perda progressiva da força muscular resulta em graves complicações para o paciente com câncer (BROWN *et al.*, 2015). A perda de massa muscular e a redução da força muscular são duas das características mais proeminentes de pacientes com câncer, e ambos levam à diminuição da capacidade funcional que pode afetar a qualidade de vida e a sobrevida (SWELLENGREBEL *et al.*, 2011). De fato, a perda da função muscular associada à caquexia aumenta o tempo de internação (6 vs 3 dias) e, assim, o custo (44%) da hospitalização em comparação com pacientes não caquéticos (ARTHUR *et al.*, 2014). AL-MAJID e MCCARTHY (2001) investigaram o efeito de 8 sessões de TR, sobre o peso e a quantidade de proteína no músculo extensor longo dos dedos (EDL), por meio de estimulação elétrica em músculo de roedores inoculados com adenocarcinoma de cólon-26. Esses autores observaram que o grupo portador de tumor treinado obteve aumento de 62% no peso e 25% na quantidade de proteína, quando comparado ao grupo tumor não treinado (AL-MAJID & MCCARTHY, 2001). Após 8 semanas de treinamento resistido, animais aumentaram a força muscular (287%), a massa do músculo FHL (23%) e conseqüentemente houve aumento (24%) das proteínas total e miofibrilares (HORNBERGER & FARRAR, 2004). Já foi descrito que múltiplas seções de exercício resistido seria capaz de aumentar a síntese de proteínas miofibrilares, sendo capaz de preservar a massa muscular, em humanos saudáveis (ZOU *et al.*, 2011). Isso ocorre porque o estímulo mecânico é capaz de aumentar a fosforilação da proteína ribossomal S6 quinase beta-1 (p70<sup>S6k</sup>), levando ao aumento da iniciação da tradução proteica no músculo esquelético (ZOU *et al.*, 2011).

Outro fator importante analisado foi o tecido tumoral, onde encontramos que o TR foi capaz de reduzir o tamanho da cápsula, aumentar a extensão de necrose e reduzir a proliferação das células tumorais. Na coloração do tecido tumoral por *Sirius red* é possível analisar a extensão da deposição de colágeno no tecido, o que provavelmente ocorre como um processo de reparo em resposta à morte celular tecidual (DE HEER *et al.*, 2000). O tumor dos animais submetidos ao treinamento apresentou uma extensão necrótica maior do que o dos animais não treinados. A presença de necrose tumoral nem sempre é um bom indicativo, uma vez que pode significar proliferação intensa de células tumorais não acompanhadas de

vascularização adequada (VONG; KALLURI, 2011). Por essa razão, analisamos a necrose tumoral juntamente com a proliferação celular do tumor, através de um marcador superexpresso em células proliferativas, o Ki67. Observamos que além de aumentar a necrose, o TR também diminuiu a proliferação celular, indicando que a necrose observada não é resultado de proliferação celular intensa. A partir desse resultado podemos sugerir que o TR foi capaz de reduzir a agressividade do tumor.

## **CONCLUSÃO**

O TR foi capaz de prevenir a atrofia muscular causada pela implantação do tumor, apesar de não prevenir a perda de peso corporal. Tais efeitos estão possivelmente associados à redução de IL-6 e da prevenção na ativação de genes relacionados ao catabolismo muscular, como a FOXO1, FOXO3 e atrogin-1. Além disso, o TR foi capaz de promover mudanças no microambiente tumoral capazes de reduzir sua agressividade demonstrada pela diminuição da proliferação e aumento da deposição de tecido conjuntivo, ainda que não tenha sido possível observar mudanças em alguns parâmetros macroscópicos, como diminuição do volume final do tumor.

## REFERÊNCIAS

AL-MAJID, S.; WATERS, H. The biological mechanisms of cancer related skeletal muscle wasting: the role of progressive resistance exercise. **Biol Res Nurs**, v.10, n.1, p.7-20, Jul 2008.

AL-MAJID, S.; McCARTHY, D. O. Resistance Exercise Training Attenuates Wasting of the Extensor Digitorum Longus Muscle in Mice Bearing the Colon-26 Adenocarcinoma. **Biol Res Nurs**, v. 2, n. 3, p. 155-166, Jan 2001.

ANTHONY, T.G. Mechanisms of protein balance in skeletal muscle. **Domest Anim Endocrin**, v.56, p.S23–S32, 2016.

ARANY, Z. PGC-1 coactivators and skeletal muscle adaptations in health and disease. **Curr Opin Genet Dev**, v.18, n.5, p.426–434. Oct 2008.

ARGILÉS, J. M. et al. Are there any benefits of exercise training in cancer cachexia? **Jour Cach Sarcop Mus**, v.3, p.73–77, 2012.

ARGILÉS, J. M. et al. Cancer cachexia: understanding the molecular basis. **Nat Rev Cancer**, v.14, n.11, p.754-62, Nov 2014.

ARGILÉS, J. M. et al. Cachexia and sarcopenia: mechanisms and potential targets for intervention. **Cur Op in Pharmacol**, v.22, p.100–106, 2015.

AOYAGI, T. et al. Cancer cachexia, mechanism and treatment. **World J Gastrointest Oncol.**, v.7, n.4, p.17-29, April 2015.

ARTHUR, S. T. et al. One-year prevalence, comorbidities and cost of cachexia-related inpatient admissions in the USA. **Drugs Context**. 2014; 3: 212265.

AULINO, P. et al. Molecular, cellular and physiological characterization of the cancer cachexia-inducing C26 colon carcinoma in mouse. **BMC Cancer**, 2010, 10:363. DOI:10.1186/1471-2407-10-363.

BALLARÒ, R.; COSTELLI P.; PENNA, F. Animals model for cancer cachexia. **Curr Opin Support Palliat Care**, v.10, n.4, p.281–287, Dec 2016.

BARACOS, V. E. Management of muscle wasting in cancer-associated cachexia: understanding gained from experimental studies. **Cancer**, v.15, n.92, p.1669-77, Sep 2001.

BATISTA, M.L. JR. et al. Adipose tissue inflammation and cancer cachexia: possible role of nuclear transcription factors **Cytokine**, 57 (2012), p. 9–16.

BESUSSO, D.; GEIBEL, M. & MINICHELLO, L. Immunohistochemical detection of preproenkephalin in the mouse brain. **Protocol Exchange**, Published online, 18 June 2013. DOI:10.1038/protex.2013.059.

BODINE, S. C AND BAEHR, L. M. Skeletal muscle atrophy and the E3 ubiquitin ligases MuRF1 and MAFbx/atrogin-1. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v.307, n.6, p.469-484, Sep 2014.

BROWN, J. C.; HARHAY, M. O.; HARHAY, M. N. Sarcopenia and mortality among a population-based sample of community-dwelling older adults. **J Cach Sarcop Musc**, Oct 2015.

COHEN, N; NATHAN, J.A.; GOLDBERG, A.L. Muscle wasting in disease: molecular mechanisms and promising therapies. **Nat Rev**, v. 14, p.58-74. 2015.

CONROY, S. M. et al. Impact of aerobic exercise on levels of IL- 4 and IL-10: results from two randomized intervention trials. **Can Medi**, v.5; n.9, p.2385–2397, Apr 2016.

CORMIE, P.; MCGUIGAN, MR.; NEWTON, RU. Influence of strength on magnitude and mechanisms of adaptation to power training. **Med Sci Sports Exerc**, v. 42, n. 8, p. 1566-81, Aug 2010.

DE, HEER. E. et al. Morphometry of interstitial fibrosis. **Nephrol Dial Transplant**,v.15, n.6 p,72-3, 2000.

DONATTO F.F. et al. Resistanceexercisemodulateslipid plasma profile and cytokinecontent in the adipose tissueoftumour-bearingrats. **Cytok**, v.61, n.2, p.426-32, Feb 2013.

FAIGENBAUM, A.D et al. Youth resistance training: updated position statement paper from the national strength and conditioning association. **J Strength Cond Res**,v.23, n.5, p.S60-79, Aug 2009.

FEARON, K. et al. Definition and classification of cancer cachexia: an international consensus. **Lancet Oncol**, v.12, p. 489–95, Feb 2011.

FONSECA, H. et al.Physical inactivity is a major contributor to ovariectomy-induced sarcopenia. **Int J Sports Med**, v. 33, n.4, p. 268-78, Apr 2012.

FRAJACOMO, F. T. T. et al. Solid Ehrlich carcinoma reproduces functional and biological characteristics of cancer cachexia. **Lif Sci**, 2016; 162: 47-53.

GORDON, B. S.; KELLEHER, A. R.; KIMBALI,S. R. Regulation of Muscle Protein Synthesis and the Effects of Catabolic States.**Int J Biochem Cell Biol**, v.45, n.10, p.2147–2157, Oct 2013.

GOTO T. et al. Highly efficient electro-gene therapy of solid tumor by using an expression plasmid for the herpes simplex virus thymidine kinase gene. **Proc. Natl. Acad. Sci**, v.97, n.1, p.354–359, 2000.

GOULD, D. W. et al. Review- Cancer cachexia prevention via physical exercise: molecular mechanisms. **J Cach Sarc Musc**, v. 4, n. 2, p. 111-24, Jun 2013.

GROUNDS, M. D. Reasons for the degeneration of ageing skeletal muscle: a central role for IGF-1 signalling. **Bioger**, v.3, p.19-24, 2002.

HARTMAN, J. W.; MOORE, D. R.; PHILLIPS, S.M. Resistance training reduces whole-body protein turn over and improves net protein retention in untrained young males. **Appl Physiol Nutr Metab**, v. 31, n. 5, p. 557-64, Oct 2006.

HORNBERGER, T. A.; FARRAR, R. P. Physiological hypertrophy of the FHL muscle following 8 weeks of progressive resistance exercise in the rat. **Can J Appl Physiol**, v. 29, n. 1, p. 16-31, Feb 2004.

HUSSEY, H. J. et al. Effect of a fluorinated pyrimidine on cachexia and tumor growth in murine cachexia models: relationship with proteolysis inducing factor. **Br J Cancer**, v. 83, n.1, p-56-62, 2000.

INUI, A. Cancer anorexia-cachexia syndrome: current issues in research and management. **CA Cancer J Clin**, v. 52, n. 2, p. 72-91, Mar-Apr 2002.

JURDANA, M. Cancer cachexia-anorexia syndrome and skeletal muscle wasting. **Radiol Oncol**, v.43, n.2, p.65-75, 2009.

KULAGINA, T. P. et al. Changes in fatty acid composition of thymus cells, liver, blood plasma, and muscle tissue in mice with solid Ehrlich carcinoma, **Biochem (Moscow)**, v.77, n.2, p.187-193, 2012.

LASEVICIUS, T. et al. Effects of different intensities of resistance training with equated volume load on muscle strength and hypertrophy. **Eur J of Sp Sci**, v.22, p.1-9, 2018.

LI, H.; MALHOTRA, S.; KUMAR, A. Nuclear factor-kappa B signaling in skeletal muscle atrophy. **Jour of Molec Med**, Berlin, v. 86, n. 10, p. 1113-1126, 2008.

LI, W. et al. Interleukin-1 stimulates catabolism in C2C12 myotubes. **Am J Physiol Cell Physiol**, v.297, n.3, p.C706–C714, Sep 2009.

LIRA, F. S. NETO, J. C. R.; SEELAENDER, M. Exercise training as treatment in cancer cachexia. **Appl Physiol Nutr Metab**, v. 34, p-679-686, Mar 2014.

LLOVERA, M. et al. Role of TNF receptor 1 in protein turnover during cancer cachexia using gene knockout mice. **Mol Cell Endocrinol** 1998, 142:183-189.

MACHADO, J. et al. Vias de sinalização intracelular na atrofia muscular e no treinamento resistido. **Fisioter. Mov.**, v.22, n.3, p.383-393, Jul./Set. 2009.

MAGDALON, J. et al. Constitutive adipocyte mTORC1 activation enhances mitochondrial activity and reduces visceral adiposity in mice. **Biochim Biophys Acta**, v.1861, n.5, p.430-438, 2016.

McGUIRE, S. World Cancer Report 2014. Geneva, Switzerland: World Health Organization, international agency for research on cancer, WHO press, 2015. **Adv Nutri.**, v.7, p.418-9, Mar 2016.

ONESTI, J. K.; GUTTRIDGED. C. Inflammation Based Regulation of Cancer Cachexia. **Bio Med Res Internac**, v. 2014, Article ID 168407, 7 pages, May 2014.

PADILHA, C. S. et al. Evaluation of resistance training to improve muscular strength and body composition in cancer patients undergoing neoadjuvant and adjuvant therapy: a meta-analysis. **J Cancer Surviv**. Published online : 04 January 2017.

PENNA, F. et al. Muscle atrophy in experimental cancer cachexia: is the IGF-1 signaling pathway involved? **Int. J. Cancer**, v.127, p.1706–1717, 2010.

PIEGARI, M. et al. Characterization of a murine lung adenocarcinoma (LAC1), a useful experimental model to study progression of lung cancer. **J Exp Ther Oncol**, v.9, n.3, p.231–9, 2011.

PORPORATO, P. E. Understanding cachexia as a cancer metabolism syndrome. **Onc**. 2016 Feb 22;5 e 200. DOI: 10.1038/oncsis. 2016.3. Publicado online 22 February 2016.

POWERS, S. K. et al. Disease-Induced Skeletal Muscle Atrophy and Fatigue. **Med & Sci in Spor & Exerc**, Published Online, 10 February 2016.

POWERS, S K. et al. Reactive oxygen species are signalling molecules for skeletal muscle adaptation. **Exp Physiol**, v.95, n.1, p.1-9. Jan 2010.

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **Eur J Pharmacol**, v. 463, n. 1-3, p. 3-33. 2003.

QUIST, M. et al. High-intensity resistance and cardiovascular training improve physical capacity in cancer patients undergoing chemotherapy. **Scand J Med Sci Sports**, v.16, n.5, p.349-57, Oct 2006.

REID, M.; LI, Y. Tumor necrosis factor- $\alpha$  and muscle wasting: a cellular perspective. **Resp Res**, v. 2, n.5, p.269-272, 2001.

RIBEIRO D. F. et al. Acute exercise alters homocysteine plasma concentration in an intensity-dependent manner due increased methyl flux in liver of rats. **Life Sci**, v.1, n.196, p.63-68, Mar 2018.

RUBIN, H. Cancer cachexia: its correlations and causes. **Proc Natl Acad Sci.**, v. 29, n.100, p.5384-9, Apr 2003.

SANDRI, M. Protein breakdown in muscle wasting: Role of autophagy-lysosome and ubiquitin-proteasome. **The Intern Jour of Biochem & Cell Biol**, v.45, p.2121– 2129, 2013.

SANDRI, M.; LIN, J.; HANDSCHIN, C. et al. PGC-1 $\alpha$  protects skeletal muscle from atrophy by suppressing FoxO3 action and atrophy-specific gene transcription. **PNAS**, v. 103, n. 44, p. 16260-16265, Oct 2006.

SECCHI, K.V; MORAIS, C. P; CIMATTI, P. F. et al. Effect of stretching and resistive exercise on skeletal muscles in rats. **Rev Bras Fisioter**, São Carlos, v. 12, n. 3, p. 228-34, mai./jun. 2008

SILVA, M. P. N. Síndrome da anorexia-caquexia em portadores de câncer. **Rev Bras de Cancerol**, v.52, n.1, p.59-77, 2006.

SPATE, U.; SCHULZEB, P. C. Proinflammatory cytokines and skeletal muscle. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v.7, p.265–269, 2004.

STRASSER, B. et al. Impact of Resistance Training in Cancer Survivors: A Meta-Analysis. **Med & Sci in Sp & Exerc**, v. 45, n. 11, p. 2080–2090, Nov 2013.

SUZUKI, H. et al. Cancer cachexia—pathophysiology and management. **J Gastroenterol**,v.48, p.574–594, 2013. DOI 10.1007/s00535-013-0787-0.

SWELLENGREBEL, H. A. et al. Toxicity and complications of preoperative chemoradiotherapy for locally advanced rectal cancer. **Br J Surg.**, v.98, n,3, p.418-426. Mar 2011.

TAN, B. H. L.; FEARON, K. C. H. Cachexia: prevalence and impact in medicine. **Clin Nutr Metab Care**, v.11, p.400–407, 2008.

TEIXEIRA, V. O. N.; FILIPPIN, L. I.; XAVIER, R. M. Mecanismos de perda muscular da sarcopenia. **Rev Bras Reumatol**, v.52, n.2, p.247-259, 2012.

TIJERINA, A. J. The biochemical basis of metabolism in cancer cachexia. **Dimens Crit Care Nurs.**, v.23, n.6, p.237–243. 2004

TISDALE, M. J. BIOMEDICINE: protein loss in cancer cachexia. **Sci**, v. 289, p.2293–2294, 2000.

TISDALE, M. J. Cancer anorexia and cachexia. **Nutr**, v.17, n.5, p.438-442, May 2001.

TISDALE, M. J. Mechanisms of cancer cachexia. **Physiol Rev**, v.89, n. 2, p. 381-410, Apr 2009.

VALÉRIO, D. A.; CUNHA, T. M.; ARAKAWA, N. S.; et al. Anti-inflammatory and analgesic effects of the sesquiterpene lactone budlein A in mice: inhibition of cytokine production-dependent mechanism. **Eur J Pharmacol**, v.562, n.1–2, p155–63, 2007.

VAUGHAN, V. C.; MARTIN, P; LEWANDOWSKI, P. A. Cancer cachexia: impact, mechanisms and emerging treatments. **J Cach Sarcop Musc**,v.4, p.95–109, 2013. DOI 10.1007/s13539-012-0087-1.

VINEIS, P.; WILD. C. P. Global cancer patterns: causes and prevention. **Lancet**, v.383, n.9916, p.549-57, Feb 2014.

VONG, S.; R, KALLURIR. The Role of Stromal Myofibroblast and Extracellular Matrix in Tumor Angiogenesis. **Gen Can**, v.2, n.12, p.1139–1145, Dec 2011. DOI: 10.1177/1947601911423940.

WINETT, R.A., & CARPINELLI, R.N. Potential health-related benefits of resistance training. **Prevent Med**, 33, 503–513, 2001.

YOSHIDA, T.; DELAFONTAINE, P. Mechanisms of cachexia in chronic disease states. **Am J Med Sci**,v.350, n.4, p.250–256. Oct 2015.

YUAN, L. et al. Muscle-specific E3 ubiquitin ligases are involved in muscle atrophy of cancer cachexia: An in vitro and in vivo study. **Oncol Rep**, v.33, p.2261-2268, Feb 2015.

ZIMMERS, T. A.; FISHEL, M. L.; BONETTO, A. STAT<sup>3</sup> in the systemic of cancer cachexia. **Semin Cell Dev Biol.**, v.54, p.28-41. Jun 2016.

ZOU, K. et al. The  $\alpha_7\beta_1$ -integrin increases muscle hypertrophy following multiple bouts of eccentric exercise. **J Appl Physiol.**, v.111, n.4, p.1134-41, Aug 2011.DOI: 10.1152/jappphysiol.00081.2011.



Universidade  
Estadual de Londrina

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA N° 005/2015

Londrina, 27 de Fevereiro de 2015

Prezado Pesquisador,

A CEUA/UUEL reunida em 02 de Dezembro de 2014 avaliou o projeto de pesquisa intitulado "**Influência do treinamento físico resistido sobre os parâmetros da caquexia muscular induzida por diferentes linhagens de células tumorais**", registrado sob o processo CEUA n°28336.2014.38, pesquisa do Centro de Educação Física e Esporte, 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 40 camundongos Swiss machos com peso aproximado de 22 g, 5 semanas de idade e provenientes do Biotério Central da UEL e 80 camundongos da linhagem C57BL/6 machos com peso aproximado de 22 g, 5 semanas de idade e provenientes do Biotério de Criação do Campus da USP/RP. O projeto tem como objetivo investigar o modelo mais coerente e homogêneo na indução da caquexia tumoral no músculo esquelético das espécies C57/BL6 e Swiss e, posteriormente, reproduzir o melhor modelo de caquexia utilizando o exercício resistido como estratégia terapêutica. Para tanto, serão testadas as linhagens tumorais carcinoma de Lewis e de melanoma B16F10 nos camundongos da linhagem C57/BL6 e células de Ehrlich nos da linhagem Swiss. Os animais serão divididos em grupos e, de acordo com os resultados obtidos na primeira etapa, serão familiarizados e submetidos à uma sessão de exercícios através de estímulos de contato, serão estimulados a realizar de 4 a 8 escaladas carregando cargas de maneira progressiva, submetidos a um programa de treinamento de resistência progressivo de 4 semanas e serão realizados testes de força durante todo o experimento como medida de ganho de força e função muscular. Os protocolos experimentais estão aprovados para execução em 24 meses.

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

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

\*  
20 julho 20 Swiss  
20 agosto 20 Swiss

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

Ilmo. Sr.  
Prof. Dr. Rafael Deminice  
Coordenador do Projeto  
Departamento de Educação Física  
Centro de Educação Física e Esporte  
Com cópia para Sra. Égle Maria de Sousa (Chefe da DCA/PROPPG), Luiz Carlos Juliani (Diretor do Biotério Central da UEL) e Diretor(a) do Centro de Educação Física e Esporte.

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

CEF