



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

CAMILA DE SOUZA PADILHA

**EFEITO DO EXERCÍCIO RESISTIDO SOBRE A PERDA DE
MASSA MUSCULAR RELACIONADA À CAQUEXIA NO
CÂNCER E DOS MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO
EM RATOS WISTAR PORTADORES DE TUMOR DE
WALKER-256**

CAMILA DE SOUZA PADILHA

**EFEITO DO EXERCÍCIO RESISTIDO SOBRE A PERDA DE
MASSA MUSCULAR RELACIONADA À CAQUEXIA NO
CÂNCER E DOS MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO
EM RATOS WISTAR PORTADORES DE TUMOR DE
WALKER-256**

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
2015

**Catálogo na publicação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

P123e Padilha, Camila de Souza.

Efeito do exercício resistido sobre a perda de massa muscular relacionada à caquexia no câncer e dos marcadores de estresse oxidativo em ratos wistar portadores de tumor de Walker-256 / Camila de Souza Padilha. – Londrina, 2015.

49 f. : il.

Orientador: Rafael Deminice.

Dissertação (Mestrado em Educação Física) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Educação Física e Esporte, Programa de Pós-Graduação em Educação Física, 2015.

Inclui bibliografia.

1. Caquexia – Câncer – Teses. 2. Stress oxidativo – Teses. 3. Proteínas – Síntese – Teses. 4. Proteínas – Degradação – Teses. 5. Exercício resistido – Teses. 6. Educação física – Teses. I. Deminice, Rafael. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Educação Física e Esporte. Programa de Pós-Graduação em Educação Física. III. Universidade Estadual de Maringá. IV. Título.

CDU 796:61

CAMILA DE SOUZA PADILHA

**EFEITO DO EXERCÍCIO RESISTIDO SOBRE A PERDA DE MASSA
MUSCULAR RELACIONADA À CAQUEXIA NO CÂNCER E DOS
MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO EM RATOS WISTAR
PORTADORES DE TUMOR DE WALKER-256**

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. Alceu Afonso Jordão Júnior
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto -
FMRP

Londrina, 22 de Maio de 2015.

Dedico este trabalho à minha família; meu pai José, minha mãe Maria (in memoriam), meus irmãos Fernando e Juninho pelo voto de confiança e apoio por poder realizar mais essa conquista.

AGRADECIMENTOS

Deus, a quem recorro no momento das minhas aflições, dúvidas e também a quem agradeço minhas conquistas. A minha família, meu pai José, por acreditar e confiar em mim, na ausência da minha mãe foi um homem corajoso, sua bravura me inspirou a nunca desistir, a nunca deixar-me abater diante das dificuldades, a levantar e continuar a caminhar. Por ter me oportunizado a dedicação exclusiva no processo de minha formação acadêmica. A minha mãe Maria (in memoriam) que infelizmente não está presente nesse momento mais esperado da minha formação, mas, que se faz presente no meu coração, minha referência feminina, mulher batalhadora, quem sempre esteve ao meu lado para me confortar, dar broncas, enfim me educar. A ela agradeço a mulher que sou hoje. Aos meus irmãos que amo de mais, Fernando e Juninho, por ter me acolhido quando eu mais precisei e pela disposição em comemorar comigo todas as euforias que vinham acompanhadas de uma conquista. Que muitas vezes exerceram o papel de irmão mais velho, mesmo sendo a mais nova e a única menina na infância foram meus amigos, companheiros. Minha melhor ponte com o passado, e possivelmente quem sempre vai me apoiar no futuro. A minha família e meu alicerce meu grande agradecimento.

Ao meu orientador Rafael, que aceitou contribuir para a minha formação e compartilhar seu conhecimento comigo, me oportunizou experiências ímpares nas quais carrego e vou carregar comigo para também oportunizar meus futuros alunos. Rafael, agradeço toda sua paciência, seu cuidado em puxar minha orelha e sua dedicação nesse processo, pela exigência em realizar todo esse trabalho com o maior cuidado e trabalhar com as minhas limitações, por explorar minhas capacidades, fazendo com que eu consiga enxergar um pouquinho mais claro as situações que antes não conseguia. Tenha a certeza que você contribuiu muito, mas muito mesmo e espero que continue contribuindo para a minha formação. Mesmo não sendo um bom jogador de futebol, é um bom orientador. Professor, meus sinceros e profundos agradecimentos pela oportunidade, conte comigo sempre.

A todos do grupo GEPEMENE, que oportunizou a ter vivência em um grupo de estudo e pesquisa, ter contato com diferentes pessoas que passaram por ele e poder contar com pessoas que participaram na minha formação. Ao mentor do grupo Prof. Dr. Edilson, que em sua vasta experiência na área acadêmica pode compartilhar sua sabedoria a cada reunião do grupo e sou grata por poder absorver, isso contribui muito na minha formação. Ao Alex, que foi meu tutor assim que entrei no grupo, teve toda a paciência com as minhas limitações e acredita que vou continuar avançando. Ao companheirismo e ajuda de todas as horas que mais precisei, agradeço por poder contar com você. Ao meu amigo David, que também tem um significado no meu caminho, uma pessoa muito especial que me ajudou nas fases difíceis dessa minha caminhada, David, obrigada por trazer tanta energia boa pelo meu caminho e espero do fundo do meu coração que você continue com essa energia, que tanto faz falta aqui no laboratório. Ao Danilo, agradeço por deixar o laboratório mais engraçado e todo o companheirismo, toda ajuda e incentivo no grupo, muito obrigada.

A coordenadora do laboratório de fisiopatologia e adaptações musculares Profa. Dra. Flávia Guarnier, que aceitou colaborar para que esse trabalho fosse da melhor forma possível. Agradeço por toda a paciência que teve comigo quando iniciei minhas atividades no laboratório. Aos colegas do laboratório que foram acolhedores e sempre estiveram de prontidão para esclarecimento de dúvidas. Ao Fernando Borges, que além de companheiro de laboratório se tornou um grande amigo, por ser mais experiente nas atividades do laboratório, foi a quem recorri em todos os momentos de desespero, sábados, domingos e feriados que pôde me acompanhar e me ajudar das análises. Fernando, o meu profundo agradecimento por sempre poder contar com você. Aos técnicos do laboratório, Zui e Pedro, que além de deixar minhas manhãs e tardes mais divertidas, tiveram todo o cuidado de me ensinar desde uma pipetagem ao preparo de reagentes. Pedro, de todo meu coração muito obrigada pela paciência e a prontidão de me ensinar a manusear os animais, os procedimentos para a confecção das lâminas de histologia, estendo meu agradecimento à Laís e a Nichelle, que sem a ajuda delas não seria possível na mesma qualidade confeccionar as lâminas, aguentaram firmes as crises de choro por eu achar que não iria conseguir mexer no micrótomo, agora estou

rindo horrores sobre isso, meninas muito obrigada por me ajudar a passar por essa fase. A Gabriela (Gabi), que sempre foi uma querida em me ajudar nas análises que precisei, agradeço, pelos desabafos e conversas jogada fora nos happy hour. A Fernanda Pascoal por ter ajudado no procedimento da implantação do tumor.

A Paola e Diogo, por ter me ajudado durante os dias de treinamentos dos animais e nos dias de coleta, muito obrigado pela colaboração, Paola agradeço sua prontidão e disposição em ajudar sempre quando foi preciso. Ao Dalmo, por disponibilizar todas as manhãs para me ajudar no processo de treinamento dos ratos, mesmo não tendo ligação com a área, no papel de amigo se sensibilizou e ajudou no momento em que eu mais precisava muito obrigada por ter me ajudado nessa fase.

Ao Prof. Dr. Alceu Afonso Jordão Júnior, por disponibilizar seu laboratório na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP para realizar análises que aqui em Londrina não seriam possíveis. A Gabriela, que ajudou na coleta de dados e quando estive em Ribeirão Preto me hospedou e me acompanhou ao laboratório para me auxiliar na análise de RNAm, a Lilian, técnica do laboratório que me auxiliou em todos os procedimentos e análise laboratoriais realizadas durante e após minha estada no laboratório. Ao Jason, aluno visitante do Canadá, que pode compartilhar comigo a experiência da vivência no laboratório em Ribeirão Preto, por ser paciente com meu idioma inglês em nossas conversas.

Ao Samir, meu terapeuta que durante alguns anos estive sempre a disposição para me ajudar, e que durante as aflições, conflitos e inquietudes, no seu divã eu encontrava a paz, calma, para enfrentar as adversidades. Amigo, sem você no meu caminho eu não seria quem sou agora.

A minha amiga de longa data, Camila Marques, que sempre me acompanhou e acreditou em mim e partilhou experiências que fizeram toda a diferença na minha vida, desde o ensino médio sabíamos que passaríamos por situações difíceis, mas sempre tínhamos fé em superar, hoje, buscamos nosso melhor, minha amiga Cá, obrigada por fazer parte da minha história e acreditar em mim, eu te amo muito. As meninas que dividem o apartamento comigo, Cláudia, Laís e Simone, que participaram da etapa final do meu trabalho, sempre com palavras de incentivo, que “daria tudo certo” e que “tudo

sairia bem”, pelo visto elas tinham razão. Hoje amigas e companheiras agradeço de todo o meu coração a compreensão de vocês e a torcida para minha formação. A pessoa que faz pouco mais de 3 meses que apareceu na minha vida, mas com jeitinho foi tomando espaço e hoje ocupa a posição de namorado, Anderson, agradeço pelo seu apoio, pelo fato de você também estar na área acadêmica, você compreende a fase que estou passando, e fico feliz por dividi-la com você, sendo das Ciências Sociais você me coloca a refletir em inúmeros aspectos da minha formação, mesmo sendo de áreas diferentes estou adorando essa experiência. Logo você estará nas condições que estou e poderá contar comigo, de todo o meu coração muito obrigado por me ensinar tanto em tão pouco tempo de convivência, adoro você meu bem.

Sem mais delongas, agradeço a vocês por fazerem parte e compartilhar desse momento tão esperado na minha vida. Muito obrigada.

*“Há momentos, e você chega a esses
momentos, em que de repente o tempo para e
acontece a eternidade.”*

Fiódor Dostoiévski

PADILHA, Camila de Souza. **Efeito do exercício resistido sobre a perda de massa muscular relacionada à caquexia no câncer e dos marcadores de estresse oxidativo em ratos wistar portadores de tumor de Walker-256.** 2015. 49 folhas. Dissertação (mestrado em Educação Física) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

RESUMO

A perda de massa muscular é a mais proeminente característica da caquexia induzida pelo câncer. Dentre as muitas estratégias objetivando prevenir, diminuir ou reverter a perda de massa muscular induzida pelo câncer, o exercício físico ganhou destaque nos últimos anos. O objetivo do presente estudo foi investigar os efeitos do exercício resistido sobre a modulação da caquexia induzida pelo câncer no músculo esquelético através de marcadores de estresse oxidativo, inflamatórios e sinalizadores de síntese/degradação proteica em ratos inoculados com tumor de Walker-256. Foram utilizados 37 ratos Wistar machos pesando 200-250g separados em 4 grupos: controle (C=9), inoculado com tumor (T=9), exercitado (E=9) e inoculado com tumor e exercitado (TE=10). O protocolo do exercício resistido consistiu na escalada do aparato de escada com pesos atados a cauda do animal. Após 6 semanas de treinamento foram implantadas 11×10^7 células de tumor de Walker-256 no flanco direito. Foram avaliados a força máxima, perda de massa corporal, índice de caquexia, avaliação morfológica do músculo gastrocnêmio, marcadores de estresse oxidativo e expressão gênica dos sinalizadores de síntese e degradação de proteínas e TNF- α . ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de Tukey foi utilizado para verificar a possível diferença entre os grupos. Após a implantação do tumor houve redução significativa da massa corporal do grupo T ($-12,2 \pm 7,8$ g) quando comparado ao grupo C ($13,0 \pm 4,9$ g), além disso, o tumor ocasionou a redução da área de secção transversa do músculo gastrocnêmio no grupo T ($P75=9.042 \mu\text{m}^2$) enquanto o grupo TE ($P75=12.553 \mu\text{m}^2$), concomitante a esse resultado a força máxima foi reduzida significativamente no grupo T ($405,46 \pm 60,6$ g) enquanto no grupo tumor exercitado a força foi preservada durante todo o experimento (TE $1225,70 \pm 42,4$ g). Somado a esses resultados, quando verificado a síntese proteica através da expressão da proteína mTOR foi possível observar redução significativa no grupo T quando comparado ao grupo C. No entanto, o exercício resistido não foi capaz de impedir a diminuição no grupo TE, quando verificado a degradação proteica não foi observado diferença significativa entre os grupos através da expressão gênica FXBO-32. Nenhuma mudança nos marcadores de estresse oxidativo e expressão de TNF- α RNAm. Diante do conjunto de informações é possível concluir que a implantação do tumor de Walker-256 promove acentuada redução do peso corporal, atrofia muscular e perda de força muscular, nos animais do grupo T em relação aos controles; tais prejuízos estão associados à diminuição da expressão gênica da mTOR, porém não ao estresse oxidativo.

Palavras-chave: Caquexia do câncer, Estresse oxidativo, Síntese de proteína, Degradação proteica, Exercício resistido.

PADILHA, Camila de Souza. **Effect of resistance exercise on muscle wasting in cachexia cancer-related and oxidative stress markers in walker 256 tumor bearing rats.** 2015. 49 pages. Dissertation (Master's Degree in Physical Education) – State University of Londrina, Londrina, 2015.

ABSTRACT

Muscle loss is the most prominent feature of cancer-cachexia. Among the many approaches aiming to prevent, slow or reverse the loss of muscle mass induced by cancer, resistance exercise is currently considered a valid strategy to mitigate and also an adjuvant treatment for patients presenting cancer cachexia syndrome. The purpose of this study was to investigate the effects of resistance exercise on modulation of cancer-cachexia in skeletal muscle, oxidative stress markers and synthesis / degradation protein in Walker-256 tumor bearing rats. Thirty-seven Wistar rats weighing 200-250 g divided into 4 groups: control (C=9), tumor bearing (T=9), exercised group (E=9) and tumor bearing exercised (TE=10). The resistance exercise protocol consisted of climbing the ladder apparatus with weights tied to the animal's tail. After 6 weeks of exercise training, Walker -256 tumor cells (11×10^7 subcutaneously) were implanted in the right flank. Maximum strength, weight loss, cachexia index, fat mass, cross-sectional area of gastrocnemius muscle, oxidative stress markers and gene expression of TNF- α , synthesis and degradation proteins were evaluated. The results were presented as mean and standard deviation values. Analysis of variance *one-way* (ANOVA) followed by Tukey post-test was used to determine possible differences between experimental groups. The results were considered significant when $P < 0.05$. After twelve days of tumor implantation, there was a significant decrease of body mass in T (-12.2 ± 7.8 g) compared to C (13.0 ± 4.9 g), this loss is associated with decreased body fat that significantly decreased in T (6.9 ± 1.7 g) compared C (3.8 ± 2.1 g). Exercise prevented weight loss demonstrated by cachexia index (%) (TE $5.0 \pm 3,2$ vs T $9.5 \pm 3,6$). In addition, reduction of muscle cross-sectional area was induced by tumor implantation ($P75=9.042 \mu\text{m}^2$), which was prevented by exercise training $P75=12.553 \mu\text{m}^2$. Concomitant with this result, the maximum force was significantly reduced in T (405.46 ± 60.6 g) while in the TE group was preserved throughout the experiment (TE 1225.70 ± 42.4 g). Significant reduction in mTOR mRNA was observed in T compared to the C; on the other hand TE group also present significant reduction compared to the C. However, no changes were observed in FXBO-32 mRNA, a key gene in degradation of proteins. No changes in muscle oxidative stress markers and TNF- α mRNA levels were observed between groups. In conclusion the implantation of the Walker-256 tumor promotes reduction in body mass, muscle atrophy and loss of muscle strength in animals T group; such losses are associated with decreased gene expression of mTOR, but not to oxidative stress.

Keywords: Cancer-cachexia. Oxidative stress. Protein synthesis. Protein degradation. Resistance training

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Via de sinalização de Síntese e Degradação de Proteína Decorrente a Caquexia do Câncer e Exercício Resistido	22
Figura 2 – Delineamento Experimental.....	25
Figura 3 – Escada utilizada para Treinamento	26

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1	CAQUEXIA DO CÂNCER: DEFINIÇÃO, DIAGNÓSTICO E PREVALÊNCIA.....	17
2.2	CONTRIBUIÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO.....	19
2.3	MEDIADORES INFLAMATÓRIOS.	20
2.4	SINALIZADORES DE SÍNTESE E DEGRADAÇÃO MUSCULAR.....	20
2.5	O PAPEL DO EXERCÍCIO RESISTIDO.....	21
3	JUSTIFICATIVA	23
4	OBJETIVOS	24
4.1	OBJETIVO GERAL.....	24
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
5	MATERIAIS E MÉTODOS	24
5.1.	ANIMAIS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	24
5.2.	PROTOCOLO DE EXERCÍCIO RESISTIDO	25
5.3.	MANUTENÇÃO E IMPLANTE DO TUMOR.....	27
5.4.	SACRIFÍCIO, COLETA E PREPARO DOS TECIDOS	28
5.5	DETERMINAÇÃO DO ESTADO CAQUÉTICO	28
5.6	MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO	29
5.6.1	Capacidade Antioxidante Total (TRAP).....	29
5.6.2	Atividade da Enzima Catalase.....	29
5.6.3	Glutathiona Reduzida (GSH)	30
5.6.4	Quimiluminescência induzida por Tert-Butil Hidroperóxido (QL)	30
5.6.5	Produtos Avançados de Oxidação Proteica (AOPP).....	31
5.7	EXPRESSÃO GÊNICA.....	31
5.8	MORFOMETRIA DO MÚSCULO GASTROCNÊMIO	32
6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	32
7	RESULTADOS	33

8	DISCUSSÃO	38
	CONCLUSÃO	43
	REFERÊNCIAS	44

1 INTRODUÇÃO

O estado de caquexia é observado em muitas doenças, incluindo câncer, doença pulmonar obstrutiva crônica, sepse, AIDS, insuficiência cardíaca crônica, cirrose hepática, insuficiência renal, artrite reumatoide, entre outras (Evans *et al.*, 2008). A caquexia induzida pelo câncer representa uma desordem metabólica complexa, caracterizada pela perda progressiva involuntária do peso corporal, perda do tecido muscular, apresentando ou não a perda do tecido adiposo em período de até seis meses (Inui, 2002). Tais complicações ainda podem promover fadiga e fraqueza, resultado de um quadro permanente de anemia e astenia. Tisdale e colaboradores (2009) relatam que cerca de 50% dos pacientes com câncer apresentam essa desordem metabólica.

A perda do tecido muscular é a característica proeminente no paciente com câncer, acarretando em diminuição da habilidade funcional e redução da qualidade de vida do paciente (Courneya, 2003). Além de ser clinicamente importante, está estritamente relacionada ao aumento da morbidade e mortalidade (Tisdale, 2009; Gould *et al.*, 2013). Estudos demonstram que a desordem no tecido muscular pode ser acarretada pelo desequilíbrio entre degradação e síntese de proteínas, mediada pela ação de radicais livres e espécies reativas do oxigênio (ERO) (Al-Majid e Waters, 2008; Powers *et al.*, 2010). Davis e colaboradores (1982) foram os pioneiros em observar que a atividade ou a inatividade muscular produz radicais livres e ERO (Davies, Packer e Brooks, 1982). Desde então, pesquisadores têm trabalhado com a hipótese de que a formação de radicais livres e ERO podem funcionar como moléculas sinalizadoras da adaptação muscular. Al-Majid e Water (2008) identificaram que mecanismos envolvidos na perda de massa muscular e caquexia, tais como, inibição do fator de iniciação eucariótica eIF2- α que está atribuído a fosforilação da via mTOR levando a diminuição da síntese de proteína, e o aumento do fator de indução à proteólise (PIF) sinalizando a ativação do fator de transcrição FoxO na via de degradação de proteína.

Neste sentido, estratégias são necessárias para prevenir, diminuir ou reverter a caquexia induzida pelo câncer. O exercício físico tem ganhado destaque nos últimos anos (Bacurau *et al.*, 2007; De Lima *et al.*, 2008; De Lima *et al.*, 2011; Donatto *et al.*, 2013; Gould *et al.*, 2013). Dentre os tipos de exercício disponíveis, o exercício resistido (ER) é adotado por promover a saúde e bem estar (ACSM, 2009),

por ter impacto positivo sobre as modificações morfológicas e funcionais do músculo esquelético (Cormie, Mcguigan e Newton, 2010), além de promover o aumento da demanda metabólica em relação ao repouso. No entanto, poucos são os estudos empenhados em estudar o ER na caquexia promovida pelo câncer.

Em estudo de revisão recente, Gould e colaboradores (2013) demonstraram que o exercício tem a capacidade de aumentar a massa livre de gordura, função e força muscular, condicionamento cardiovascular, além de diminuir fadiga em pacientes com câncer (Gould *et al.*, 2013). Donatto e colaboradores (2013) demonstraram que o treinamento resistido previniu a perda de massa muscular e diminuiu a massa tumoral (~40%) em ratos portadores na forma sólida do carcinosarcoma de Walker-256 (Donatto *et al.*, 2013). Strasser e colaboradores (2013) em uma revisão sistemática com meta-análise indicam que o ER tem um papel promissor no aumento da qualidade de vida, força muscular de membros inferiores e diminuição dos sinais de fadiga em pacientes com câncer (Strasser *et al.*, 2013). No entanto, os estudos citados a cima exploram de forma especulatória os possíveis mecanismos envolvidos na desordem muscular ocasionado pela caquexia induzida pelo câncer. Portanto, na tentativa de elucidar esse problema, cabe a esse trabalho explorar a contribuição do ER sobre as vias sinalizadoras de síntese e degradação de proteínas e a participação dos radicais livres e ERO envolvidos na caquexia do câncer.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CAQUEXIA NO CÂNCER: DEFINIÇÃO, DIAGNÓSTICO E PREVALÊNCIA.

De acordo com a Society for Cachexia and Wasting Disorders (2006) a caquexia é definida como uma complexa síndrome metabólica associada ao câncer e caracterizada pela perda da massa muscular associada ou não à perda do tecido adiposo (Evans *et al.*, 2008). A proeminente característica clínica da caquexia é a perda de peso em adultos (corrigido pela retenção de fluidos) ou a falha no crescimento em crianças (excluindo desordens endócrinas). Anorexia, inflamação, resistência à insulina, e aumento na degradação de proteínas e má absorção são frequentemente associada com o aumento da morbidade.

No sentido de melhorar o diagnóstico da caquexia, Farkas e colaboradores (2013) apontam a necessidade de o paciente apresentar os seguintes sintomas: perda de peso >5% em um período menor que 12 meses ou índice de massa corporal <20 kg/m² e 3 a 5 critérios adicionais, entre: fadiga, diminuição da força muscular, anorexia, baixo índice de massa livre de gordura, anemia (<120g/L), albumina sérica <32g/L, proteína-C reativa >5mg/L e IL-6 >4pg/mL (Farkas *et al.*, 2013). Dado o critério de diagnóstico, Von Haehling e Anker (2014) citam que 1% da população mundial, ou seja, nove milhões de pacientes com câncer são afetados pela caquexia o que representa uma prevalência de 30% em todos os tipos de câncer (Von Haehling e Anker, 2014).

Argiles e colaboradores (2014) estimam que a caquexia afeta 50-80% dos pacientes com câncer e é responsável por 20% das causas de morte (Argilés *et al.*, 2014). Tisdale (2009) aponta que a incidência da caquexia em alguns tipos de câncer é maior. Pacientes com câncer pancreático ou gástrico apresentam maior frequência em perda de peso: 85% dos pacientes com câncer no pâncreas são diagnosticados caquéticos, apresentando uma média de perda de peso de 14,2% em um período de 6 meses e esse valor aumenta em média 24,5% até a última avaliação antes da morte (Tisdale, 2009).

Diante das complicações geradas pela caquexia, a perda substancial de massa muscular é ocasionada especialmente pela diminuição do *turnover* de proteínas decorrente da elevada taxa de degradação de proteínas no músculo. Alguns autores sugerem que vias proteolíticas específicas são ativadas, ao mesmo tempo em que também que ocorre a diminuição da síntese de proteínas (Gordon, Green e Goggin, 2005; Gould *et al.*, 2013; Biolo, Cederholm e Muscaritoli, 2014; Penna, Baccino e Costelli, 2014). A diminuição da síntese de proteína pode ser resultado da diminuição da concentração de insulina no plasma e a sensibilidade do músculo esquelético, bem como, o metabolismo de aminoácidos que em parte é alterado pela diminuição da sensibilidade a insulina (Gordon, Kelleher e Kimball, 2013).

Estudos recentes têm demonstrado que o estado catabólico induzido pelo câncer está associado a elevados níveis de citocinas pró-inflamatórias (De Lima *et al.*, 2008; Durham, Dillon e Sheffield-Moore, 2009; Donatto *et al.*, 2013), aumento do estresse oxidativo (Guarnier *et al.*, 2010) e modulação de sinalizadores de

síntese e degradação proteica no músculo esquelético (Penna, Bonetto, *et al.*, 2010; Reed *et al.*, 2012; Gould *et al.*, 2013).

2.2 CONTRIBUIÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO.

Estresse oxidativo é caracterizado pelo desequilíbrio entre a exacerbada produção de radicais livres (RL) e de espécies reativas de oxigênio (ERO) e a incapacidade de neutralização dos mesmos através de um sistema de defesa antioxidante (Halliwell e Gutteridge, 2007). O envolvimento de RL e ERO nos mecanismos patogênicos da carcinogênese tem sido amplamente documentado.

Nos últimos anos, os radicais livres têm sido apontados como importantes moduladores de processos biológicos, incluindo controle de massa muscular (Guarnier *et al.*, 2010; Powers *et al.*, 2010). Modelos de atrofia por inatividade aumentam a formação de hidroperóxidos e de lipoperoxidação, com concomitante redução das atividades da catalase e da glutathione peroxidase (Lawler, Song e Demaree, 2003). De acordo com Tisdale (2001), a degradação de músculo esquelético de camundongos tratados com TNF- α é mediada pela produção de moléculas radicalares (Tisdale, 2001). Em um modelo de perda muscular, o TNF- α induziu o estresse oxidativo e a síntese de óxido nítrico sintase (NOS) no músculo esquelético. O tratamento com os antioxidantes, α -tocoferol, BW755c ou inibidor da óxido nítrico sintase preveniu a perda muscular e as anormalidades moleculares do músculo esquelético (Buck e Chojkier, 1996). Assim, existem evidências de que a formação de RL e ERO está estritamente relacionada à modulação da massa muscular inclusive no câncer (Guarnier *et al.*, 2010). Guarnier e colaboradores (2010) demonstraram níveis elevados de peroxidação lipídica pela avaliação de malonilaldeído (MDA) e carbonilação de proteínas em ratos inoculados com tumor de Walker-256 por um período de 10 dias e níveis reduzidos da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) e capacidade antioxidante total plasmática (TRAP). Esse quadro de estresse oxidativo estava relacionado ao aumento da expressão da atrogin-1, importante indicador de degradação proteica (Guarnier *et al.*, 2010).

2.3 MEDIADORES INFLAMATÓRIOS.

Estudos recentes têm demonstrado que citocinas pró-inflamatórias, produzidas por células tumorais, apresentam envolvimento importante na patogênese da perda de massa muscular no câncer. Entre as citocinas mais estudadas o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e as interleucina-1 e 6 (IL-1 e IL-6) têm sido apontados como importantes mediadores fisiopatológicos da caquexia no câncer (Korekane, Nishikawa e Imamura, 2003; De Lima *et al.*, 2008; Sakuma e Yamaguchi, 2012; Donatto *et al.*, 2013). Estas substâncias, liberadas principalmente pelas células do sistema imune, exercem respostas biológicas responsáveis por importantes metabólicas associadas à caquexia.

Trabalhos demonstram aumento significativo em mediadores inflamatórios em humanos e animais com câncer, especialmente TNF- α e IL-1 β (De Lima *et al.*, 2008; Gould *et al.*, 2013). Inúmeras evidências sugerem que o TNF- α está também correlacionado com a perda de massa muscular verificada em pacientes caquéticos. Utilizando técnica de infusão de ¹⁴C-leucina, Flores e colaboradores (1989) mostraram que a administração crônica de TNF- α aumenta significativamente a degradação de proteína muscular (Flores *et al.*, 1989). A administração *in vivo* de TNF- α em ratos resulta em um aumento da proteólise muscular associado a um aumento na expressão dos genes e nos níveis de ubiquitina (Argilés *et al.*, 2005), sistema importante de degradação proteica. Outras citocinas como IL-1 e IL-6 também são capazes de ativar a expressão dos genes para ubiquitina (Durham, Dillon e Sheffield-Moore, 2009; Tisdale, 2009). Assim, estudos tem demonstrado a relação estrita entre citocinas pró-inflamatórias e a perda de massa muscular no câncer (Korekane, Nishikawa e Imamura, 2003; De Lima *et al.*, 2008; Durham, Dillon e Sheffield-Moore, 2009).

2.4 SINALIZADORES DE SÍNTESE E DEGRADAÇÃO MUSCULAR.

Nos últimos anos, o papel do IGF-1 na regulação da massa muscular esquelética tem sido investigado com particular atenção. IGF-1 é um fator anabólico que estimula a síntese proteica assim como a proliferação e a diferenciação celular (Penna, Bonetto, *et al.*, 2010). Esse sinalizador exerce efeito anti-apoptótico em células musculares e inibe a proteólise através do sistema

ubiquitina-proteasoma, inibindo atrofia do músculo esquelético (Durham, Dillon e Sheffield-Moore, 2009; Penna, Bonetto, *et al.*, 2010). A Akt, proteína chave intermediária no metabolismo de sinalização do IGF-1e de todas as outras vias tróficas de sinalização, tem papel regulador de moléculas sinalizadoras da síntese ou degradação proteica (Gould *et al.*, 2013). Trabalhos recentes têm demonstrado que a ativação da Akt, resulta no acionamento de moléculas específicas relacionada à síntese proteica (Al-Majid e Waters, 2008; Penna, Bonetto, *et al.*, 2010), através do metabolismo PI3K/Akt/mTOR. A ativação desse sistema ainda é inibidor da expressão do fator de transcrição FoxO e de suas ligases específicas atrogin-1 e MuRF-1 no músculo esquelético, responsáveis pela sinalização de ativação de degradação proteica através do sistema ubiquitina-proteasoma, uma via proteolítica importante (Penna, Costamagna, *et al.*, 2010). Estudos têm demonstrado diminuição da atividade no metabolismo PI3K/Akt/MTOR em modelos de perda de massa muscular induzidos por denervação, desuso, em idosos caquéticos (Schiaffino *et al.*, 2013) e caquexia induzida pelo câncer (Penna, Bonetto, *et al.*, 2010). Em contrapartida, Reed e colaboradores (2012) demonstraram que a inibição do fator de transcrição FoxO em camundongos caquéticos induzido pelo câncer, preveniu a atrofia muscular (Reed *et al.*, 2012).

Outro fator importante que contribui para a diminuição da síntese muscular proteica em pacientes com câncer é a inatividade física que ocorre especialmente pela fraqueza e fadiga aumentada decorrentes da caquexia (Tisdale, 2009). A diminuição da atividade contrátil muscular deprime a síntese muscular proteica (Courneya, 2003) que pode gerar atrofia muscular. Estudos demonstram diminuição na expressão de fatores sinalizadores (Akt e MTOR) induzidos pela diminuição da atividade física.

2.5 O PAPEL DO EXERCÍCIO RESISTIDO

O exercício resistido (ER) é atualmente considerado uma estratégia válida para atenuar a perda de massa muscular e também um tratamento coadjuvante para pacientes com câncer apresentando síndrome caquexia (Donatto *et al.*, 2013).

Estudo realizado por Jones e colaboradores (2010) indica que o ER aumenta a área de secção transversa do músculo, e a força (~ 25%), indicando uma

grande melhora na função muscular de pacientes acometidos com a caquexia (Jones *et al.*, 2010). Trabalhos com roedores têm a finalidade de entender como o ER modula os mecanismos envolvidos na caquexia induzida pelo câncer. Bacurau *et al.* (2007), Lima *et al.* (2008), Donatto *et al.* (2012) em seus respectivos estudos mostraram que o ER diminui a progressão do tumor em média 10%, aumenta também a atividade de macrófagos e linfócitos, melhorando o sistema imune e aumento também o índice de fagocitose. Além disso, O ER parece ser capaz de prevenir parcialmente a perda da massa muscular e o peso corporal, preservando o conteúdo de glicogênio e diminuindo o fator de indução de proteólise (PIF) (Bacurau *et al.*, 2007; De Lima *et al.*, 2008; Donatto *et al.*, 2013).

Diante dos estudos mostrados a cima, o ER oferece um estímulo de receptores mecânicos que é um potente estímulo para a síntese muscular. Há tempo é conhecido o efeito do treinamento em gerar hipertrofia e aumentar a força muscular, além de outros benefícios como aumento da flexibilidade, capacidade cardiorrespiratória, e função física (Penna, Bonetto, *et al.*, 2010; Gould *et al.*, 2013). No entanto, estudos explorando os efeitos do ER em pacientes com câncer são escassos (Al-Majid e Waters, 2008). Além disso, muitos dos estudos envolvendo exercício e câncer utilizaram exercícios aeróbicos. Al-Majid e Waters (2008) em revisão de literatura, apontou apenas 4 estudos envolvendo ER em indivíduos e modelos de câncer (Al-Majid e Waters, 2008).

A maioria dos estudos tem apontando efeitos benéficos do exercício contra sintomas e distúrbios causados pelo câncer, aumentos e/ou conservação da massa muscular (Burnham e Wilcox, 2002), redução de estresse oxidativo e de citocinas pró-inflamatórias (Petersen e Pedersen, 2005), além de promover bem estar e qualidade de vida (Courneya, 2003; Segal *et al.*, 2003) pacientes com câncer. No entanto, poucos são os trabalhos que avaliaram o efeito do exercício resistido sobre a perda de massa muscular induzida pelo câncer. Ainda, até o momento os mecanismos fisiológicos relacionados à perda de massa muscular e como o ER pode modular tais mecanismos não são conhecidos. A figura 1 resume o comportamento da via de sinalização de degradação de proteína decorrente da caquexia do câncer e via de sinalização de síntese de proteína decorrente ao ER.

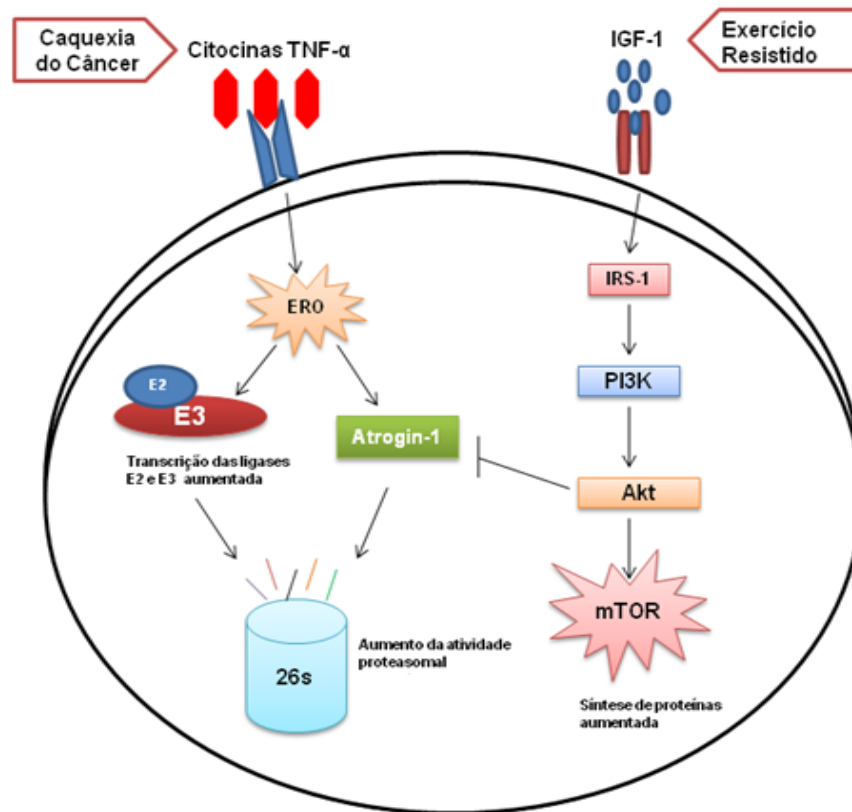


Figura 1: Resumo sobre o comportamento da via de sinalização de degradação de proteína decorrente a caquexia do câncer e via de sinalização de síntese de proteína decorrente ao exercício resistido. IRS-1: Insulin receptor substrate 1, PI3K: Phosphoinositide 3-kinase, Akt: Protein Kinase B, mTOR: Mammalian target of rapamycin, ERO: Espécies reativas do oxigênio.

3 JUSTIFICATIVA

O músculo esquelético é severamente afetado na caquexia induzida por câncer e o grau de perda de massa magra está associado à redução da expectativa de vida de pacientes com câncer. No entanto, ainda há uma lacuna sobre o esclarecimento dos mecanismos pelo qual o exercício resistido pode modular a caquexia induzida pelo câncer. A hipótese levantada nesse trabalho é que o exercício resistido seja capaz de atenuar a perda da massa muscular via aumento da sinalização de síntese de proteína.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo da presente dissertação foi investigar os efeitos do ER sobre a modulação da caquexia induzida pelo câncer através de marcadores de estresse oxidativo e sinalizadores de síntese/degradação proteica em ratos inoculados com tumor de Walker-256.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. ANIMAIS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foram utilizados 44 ratos Wistar machos pesando entre 200-250g, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina e mantidos no Biotério do Departamento de Ciências Patológicas durante o experimento. Os animais foram acomodados em gaiolas coletivas 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 (CEUA n 10670.2013.46). Este projeto segue as recomendações do Código Brasileiro para Utilização de Animais de Laboratório. Os animais foram inicialmente divididos em quatro grupos, sendo eles: grupo controle (C=9), grupo inoculado com tumor (T=9), grupo exercitado (E=9) e grupo inoculado com tumor e exercitado (TE=10).

Uma semana antes do início do treinamento com ER, os animais foram familiarizados ao movimento de escalada em aparato descrito a seguir. Após seis semanas de treinamento resistido, o tumor foi implantado no flanco subcutâneo na pata direita dos animais do grupo T e TE. Animais do grupo C e E receberam injeção com PBS. Todos os animais mantiveram a mesma rotina de treinamento resistido após implantação do tumor ou injeção de PBS e foram sacrificados após 12 dias de implantação do tumor (Figura 2).

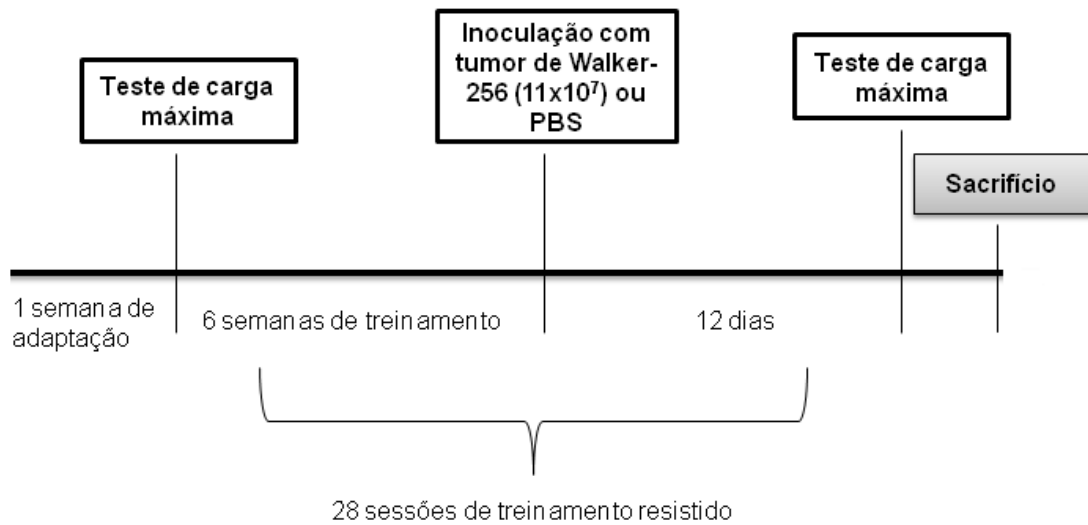


Figura 2. Delineamento experimental

5.2. PROTOCOLO DE EXERCÍCIO RESISTIDO

O ER consistiu em subir um aparato em forma de escada (Figura 3) com dimensões de 1,1 x 0,18 m, 2 cm entre os degraus e 80° de inclinação de acordo com o descrito por Hornberger e Farrar (2004). A escada tem o comprimento necessário para os animais realizarem de 8 a 12 movimentos dinâmicos (repetições) por subida. Na parte superior da escada, foi construída câmara de alojamento medindo (20 x 20 x 20 cm) que foi utilizada para os intervalos de recuperação dos animais.

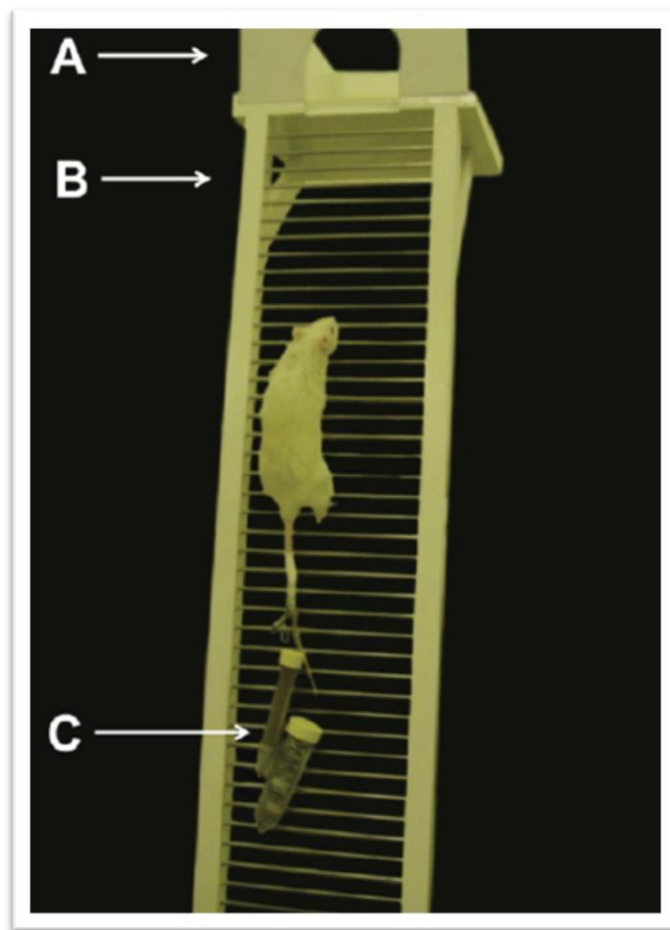


Figura 3. Escada de ER utilizado para treinamento dos animais. Câmara de descanso (A), degraus da escada (B), tubos cônicos com carga atado a cauda do animal para controle da intensidade do esforço.

Antes do início do treinamento com ER, os animais foram adaptados ao movimento de escalada e à rotina de treinamento com o objetivo principal de reduzir o estresse causado pelos mesmos. Os animais foram estimulados a subir a escada de exercícios, quatro vezes por sessão durante 5 dias consecutivos sem a adição de sobrecarga. Os estímulos consistiam de leves impulsos (empurrões) na traseira do animal, sem que esses gerassem dor, a cada vez que o ciclo de movimento era interrompido. Ao chegar à câmara de descanso no final da escada, os animais eram mantidos em repouso por 2 minutos. Ao final do período de adaptação, os animais estavam aptos a subir toda a escada de exercício voluntariamente sem a necessidade de estímulos.

Após o período de familiarização, teste de força máxima foi aplicado em todos os animais com o objetivo principal de determinar intensidades de

treinamento (Hornberger e Farrar, 2004). O teste de carga máxima foi iniciado com a fixação de frascos cônicos na porção proximal da cauda com peso correspondente a 75% do peso corporal total do animal. Os animais foram estimulados a escalar todo o aparato até a câmara de descanso por quatro vezes com 2 minutos de descanso entre as repetições. A cada escalada subsequente, 30 g de pesos foram adicionadas à cauda do animal. Esse procedimento de incremento de carga foi repetido até que o animal não conseguisse completar a toda a subida por 3 tentativas consecutivas. O peso carregado na última tentativa de escalada com sucesso foi considerada carga máxima.

Setenta e duas horas após o teste de carga máxima, foi iniciado o programa de ER para os animais dos grupos E e TE. Os animais dos grupos C e T permaneceram sedentários por todo o período de experimento. O protocolo de treinamento consistiu em 4 a 8 escaladas completas, com os animais carregando 50%, 75%, 90% e 100% do peso máximo carregado na última sessão de treinamento, durante as 4 primeiras escadas, respectivamente. Durante as subidas subsequentes, 30g de peso foi acrescentado à cauda do animal até que esse não conseguisse completar a escalada por 3 tentativas consecutivas, ou realizasse 8 escaladas completas no total. Esse procedimento foi realizado 3 vezes por semana com intervalo 48 horas entre as sessões, num total de 8 semanas somando 28 sessões de treino. O peso final de cada sessão foi utilizado como parâmetro de ganho de força muscular. Os animais dos grupos C e T foram submetidos ao teste de carga máxima a cada duas semanas para determinação da força muscular (Hornberger e Farrar, 2004).

5.3. MANUTENÇÃO E IMPLANTE DO TUMOR

O tumor de Walker-256, um carcinosarcoma mamário, foi mantido em laboratório através de passagens semanais de células viáveis para a cavidade abdominal de ratos Wistar adultos machos. A quantidade de células viáveis foi determinada em câmara de Neubauer e exclusão pelo azul de Tripán. Para implante do tumor sólido durante a fase experimental, 11×10^7 células viáveis foram inoculadas de forma subcutânea no flanco direito em 0,5 ml de PBS nos animais dos grupos experimentais. Animais controle receberam 0,5 ml de PBS.

5.4. SACRIFÍCIO, COLETA E PREPARO DOS TECIDOS

No momento do sacrifício, os animais foram submetidos à anestesia com ketamina e xilazina (150/30 mg/kg), sofreram abertura da cavidade abdominal e tiveram o sangue colhido pela veia porta abdominal em tubos heparinizados. O sangue foi centrifugado, o plasma separado e armazenado a -80°C para posteriores análises. Os músculos gastrocnêmio, sóleo, flexor longo do halux e plantar foram retirados, pesados, imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenado a -80C para posteriores análises. A gordura epidídimal e retroperitônia foi dissecada e pesada como parâmetro de gordura corporal.

O tumor dos grupos de animais experimentais foi dissecado cuidadosamente para pesagem e realização do cálculo da caquexia. Após esses procedimentos o tumor foi descartado.

5.5 DETERMINAÇÃO DO ESTADO CAQUÉTICO

A determinação da caquexia foi feita de acordo com a seguinte fórmula:

$$\% \text{ perda de massa corpórea} = \frac{[m_i - m_f + (m_t) + gmc]}{(m_i + gmc)} \times 100$$

Onde :

m_i - massa inicial do animal com tumor; m_f - massa final do animal com tumor; m_t - massa do tumor; gmc - ganho de massa do animal controle (Guarnier et al, 2010).

Para este cálculo, foi utilizada a média do ganho de massa corpórea (GMC) obtida através do acompanhamento do ganho de massa corporal apresentado pelos animais do grupo controle durante os 12 dias de tumor. Os animais foram considerados caquéticos quando a porcentagem de perda de massa corpórea for maior que 10%. A perda de massa muscular (%) foi calculada usando os valores de massa do músculo gastrocnêmio, em relação à média apresentada dos respectivos músculos dos animais do grupo controle (Guarnier *et al.*, 2010)

5.6 MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO

5.6.1 Capacidade Antioxidante Total (TRAP)

A capacidade antioxidante total foi determinado pelo método proposto por Repetto e colaboradores (1996) (Repetto *et al.*, 1996). Esse método detecta os antioxidantes lipossolúveis e hidrossolúveis, através do método de quimiluminescência por tempo de indução do 2, 2-azobis (2-amidinopropane). O composto 2, 2-azobis (ABAP) sofre uma decomposição térmica a 37°C, gerando radical peroxil e para ampliar esta reação é adicionado luminol, um composto mais instável que o peroxil, capaz de captar os elétrons desemparelhados e amplificar a emissão de luz e o registro de sinal no luminômetro. Para o ensaio, 50mg de músculo gastrocnêmio foi homogeneizado em 1 mL de tampão fosfato monobásico 10 mM pH 7,4 NaCl 0,9%. Em 70 µL do homogenato foi adicionado 830 µL de tampão glicina mantido em banho 37°C, 50 µL de luminol e 50 µL de ABAP, a leitura foi realizada por volta de 10 minutos de duração. A leitura foi realizada em duplicatas em um luminômetro TD 20/20 marca Promega[®] utilizando uma sensibilidade de 50,1% e comparado com curva padrão utilizando Trolox.

5.6.2 Atividade da Enzima Catalase

A atividade da catalase foi determinada no músculo gastrocnêmio pela mensuração de decomposição de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em uma leitura de 230 nm como é proposto por (Aebi, 1984). A enzima catalase presente na amostra degrada o H₂O₂ adicionado na reação, e, conseqüentemente, observa-se redução da absorbância. Foi preparada uma solução de H₂O₂ 200 mM (220 µL de tampão TRIS 1M + 2 mL de água + 64µL de H₂O₂ 30 v). Para esse ensaio foi utilizado um homogenato do tecido na concentração de 50mg/mL em tampão fosfato de potássio monobásico 10 mM pH 7,4/ NaCl 0,9%. Em 200 µL do homogenato foi adicionado 1500 µL de tampão TRIS e 200 µL de água destilada e 100 µL de H₂O₂. A reação foi realizada em cubetas de quartzo e em uma leitura de 240nm no espectrofotômetro da marca Shimadzu.

5.6.3 Glutathiona Reduzida (GSH)

A dosagem de GSH foi realizada no músculo gastrocnêmio seguido o método descrito por (Rahman, Kode e Biswas, 2006) que é baseada na reação da GSH com o composto 5,5'-diti-biois-2-ácido nitrobenzóico (DTNB), formando um composto de cor amarela 5-thionitrobenzoato (TNB) que absorve em 412 nm. Foi realizado uma leitura da curva padrão de GSH, em 5 µL da solução padrão foi adicionado 645 µL de água, 100 µL de tampão TRIS, 50 µL de DTNB, 100 µL Glutathiona redutase e 100 µL de NADPH. Para esse ensaio foi utilizado um homogenato de 50mg de músculo gastrocnêmio em 1mL de tampão fosfato de potássio monobásico 10 mM pH 7,4/ NaCl 0,9%. Em 50 µL de homogenato foi adicionado 600 µL de água, 100 µL de tampão TRIS, 50 µL de DTNB, 100 µL Glutathiona redutase e 100 µL de NADPH.

5.6.4 Quimiluminescência induzida por Tert-Butil Hidroperóxido (QL)

A técnica de QL foi realizada no músculo gastrocnêmio conforme descrito por (Gonzalez Flecha, Llesuy e Boveris, 1991). O composto tert-butil hidroperóxido é um potente formador de radicais peroxil que ataca os lipídeos de membrana gerando lipoperóxidos que podem reagir com outros lipídeos, oxidando-os. Assim, o tert-butil inicia uma reação de lipoperoxidação que pode ser detectada através da emissão de fótons ocorrida durante a formação dos lipoperóxidos. Para esse teste utilizou-se 10mg/mL do tecido cardíaco homogenizado em tampão fosfato monobásico a 10mM pH 7,4 NaCl 0,9%. Em 875µL do homogenato foi acrescentado 105µL do mesmo tampão utilizado para preparar o homogenato e posto em incubação por 5 minutos em banho 37°C, após esse período foi acrescentado 20µL da solução de tert-butil hidroperóxido (38,6µL de tert-butil em 1ml de água), deixando que o luminômetro TD 20/20 marca Promega® faça a leitura utilizando uma sensibilidade de 68,5%. Os resultados foram expressos em unidade relativa de luz por miligrama de tecido (URL/mg tecido).

5.6.5 Produtos Avançados de Oxidação Proteica (AOPP)

A determinação de produtos avançados de oxidação proteica foi através do protocolo usado por (Witko-Sarsat *et al.*, 1996) no músculo gastrocnêmio. Para esse ensaio utilizou-se 150 mg de músculo gastrocnêmio em 1 mL de PBS. Em 40 μ L do homogenato foi adicionado 10 μ L de iodeto de potássio, 150 μ L de PBS, e a primeira leitura realizada a 340 nm. Em seguida, após a adição de 20 μ L de ácido acético e 3 minutos de incubação a temperatura ambiente, nova leitura foi realizada a 340 nm. Os valores foram comparados com curva padrão de cloramina-T

5.7 EXPRESSÃO GÊNICA

O RNA foi isolado de 100 mg do músculo flexor longo do halux usando o kit RiboPure (Ambion, part number AM 1924, USA) seguindo as instruções do fabricante. O RNA total foi quantificado por espectrofotometria pelo equipamento OD 260/280 (NanoDrop2000c, ThermoScientific, USA). A qualidade e integridade do RNA isolado foi avaliado usando um gel 1.2% de agarose e eletroforese. Foi realizado um tratamento adicionando DNase (DNA-free Kit, Ambion, part number AM1906, USA) para remover DNA contaminado do RNA isolado. cDNA foi sintetizado utilizando 1000 ng de RNA através de kit (Applied Biosystems, part number 4374966, USA) de alta capacidade de transcrição reversa. A quantificação foi realizada através de PCR em tempo real usando no equipamento 7500 Fast Real-time PCR System (Applied Biosystems, USA). Foram utilizadas as seguintes sondas de expressão gênica Taqman[®] Gene Expression probes (Applied Biosystems, USA): Fbxo32 (F-box proteína 32) Rn00591730_m; Mtor (mechanistic target of rapamycin (serine/threonine kinase) Rn00571541_m1; Tnfa (tumor necrosis fator) Rn00562055_m1. Todas as amostras foram realizadas em triplicatas. A sonda 18S foi usado como gene de referência para a normalização da reação. A quantificação relativa foi determinada pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$.

5.8 MORFOMETRIA DO MÚSCULO GASTROCNÊMIO

O músculo gastrocnêmio foi retirado por corte transversal. As amostras foram talcadas e congeladas em nitrogênio líquido no momento da coleta, sendo armazenado em freezer -80 °C até o processamento histológico. Para iniciar o procedimento de inclusão em parafina as amostras foram destalcadas em tampão PBS gelado. Após esse procedimento, as amostras foram mantidas no fixador (30 ml de metanol + 10 ml de ácido acético glacial) por 1 hora e 30 minutos e logo após foram mantidas em álcool absoluto durante 6 horas. Para finalizar o processo de inclusão as amostras passaram por banhos de 30 minutos em álcool 70%, álcool 95%, álcool absoluto, álcool absoluto + xilol, xilol e xilol + parafina. As amostras foram incluídas em parafina e cortes semi-seriados de 5µm de espessura foram realizados (5 cortes/lâmina). Após a confecção das lâminas, as peças foram coradas em solução de hematoxilina e eosina, fotografados em fotomicroscópio no aumento de 20x e a análise morfométrica para quantificação da área de secção transversa do músculo gastrocnêmio foram realizadas por meio do programa Image-Pro Plus® 23 4.5 (Media Cybernetics, Rockville, EUA).

6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram apresentados em valores de média e desvio padrão. Análise de variância (ANOVA) *one-way* seguido de *post-test* de Tukey foram utilizados para determinar possíveis diferenças entre os grupos experimentais. O teste *t* de student foi realizado para testar a diferença das médias no índice de caquexia. Os resultados foram considerados significativos quando $P < 0,05$. O programa Origin 8.6, GraphPad Prisma 5 foram utilizados para as análises estatísticas.

7 RESULTADOS

A tabela 1 apresenta os dados de ganho de peso, índice de caquexia, peso final do tumor e peso do tecido adiposo e muscular dos grupos estudados. Doze dias após a implantação com tumor de Walker-256, os animais do grupo T apresentaram diminuição significativa ($P < 0,05$) do peso corporal quando comparado com o controle. Tal perda está associada à redução da gordura corporal que apresentou diminuição significativa somente no grupo T quando comparado com o controle. Apesar da diminuição do peso de todos os músculos estudados (redução de 9% no somatório de tecido muscular), não houve diferença significativa entre o grupo T e C. Em contrapartida, o ER amenizou de forma significativa a perda de peso induzida pelo tumor, claramente demonstrado pela diminuição significativa do índice de caquexia no grupo TE quando comparado com o grupo T. Tal dado é resultado do aumento encontrado no peso do músculo flexor longo do halux e na somatória de todos os músculos no grupo E quando comparado com os demais grupos.

Tabela 1. Características gerais dos animais dos grupos controle (C), inoculados com tumor (T), exercitado (E) e inoculados com tumor e exercitado (TE).

	C (n = 9)	T (n = 9)	E (n = 9)	TE (n = 10)
Ganho de peso após inoculação (g)	13,0±4,9 ^a	-12,2±7,8 ^b	11,7±6,1 ^a	3,2±7,1 ^a
Peso final do tumor (g)	-	8,2±4,4	-	8,4±3,4
Índice de caquexia (%)	-	9,5±3,6 ^a	-	5,0±3,2 ^b
Gordura do epidídimo (g)	2,8±1,4	1,4±1,1	2,3±0,6	1,6±0,3
Gordura retorperitoneal (g)	4,0±1,1	2,4±1,1	3,1±1,1	3,1±0,7
∑ peso gordura (g)	6,9±1,7 ^a	3,8±2,1 ^b	5,4±0,8 ^{ab}	4,7±1,0 ^{ab}
Músculo gastrocnêmio (g)	1,83±0,32	1,73±0,10	1,98±0,19	1,83±0,20
Músculo flexor longo do halux (g)	0,52±0,15 ^a	0,42±0,10 ^a	0,70±0,10 ^b	0,53±0,16 ^a
Músculo sóleo (g)	0,35±0,07	0,33±0,02	0,38±0,05	0,37±0,04
∑ peso músculo (g)	2,70±0,28 ^a	2,48±0,14 ^a	3,06±0,25 ^b	2,72±0,27 ^a

Dados são apresentados em média e desvio padrão. a, b letras diferentes na mesma linha apontam diferença significativa entre os grupos ($P < 0,05$, ANOVA *one-way* seguido de teste *post-test* de *Tukey*). A avaliação do peso final do tumor e do índice

de caquexia foi realizada através do teste t de *student*.

Na figura 1 está apresentada a evolução da carga máxima e carga final alcançada pelos animais de todos os grupos experimentais nas 28 sessões de treinamento para os grupos E e ET e em cinco testes para os grupos C e T. Os dados demonstram aumento significativo na força dos animais treinados (grupos E e ET) com relação aos animais sedentários a partir da 12^a sessão de treinamento. Foi observada redução significativa na força muscular dos animais do grupo T após a implantação com tumor de Walker-256 quando comparado ao controle e grupos treinados (grupos E e ET). O último teste de carga máxima revelou que a implantação com tumor promove perda de força muscular nos animais do grupo T em relação ao controle. Em contrapartida, o treinamento resistido além de prevenir a perda de força muscular, apresentou-se eficaz em aumentar a mesma nos animais do grupo ET.

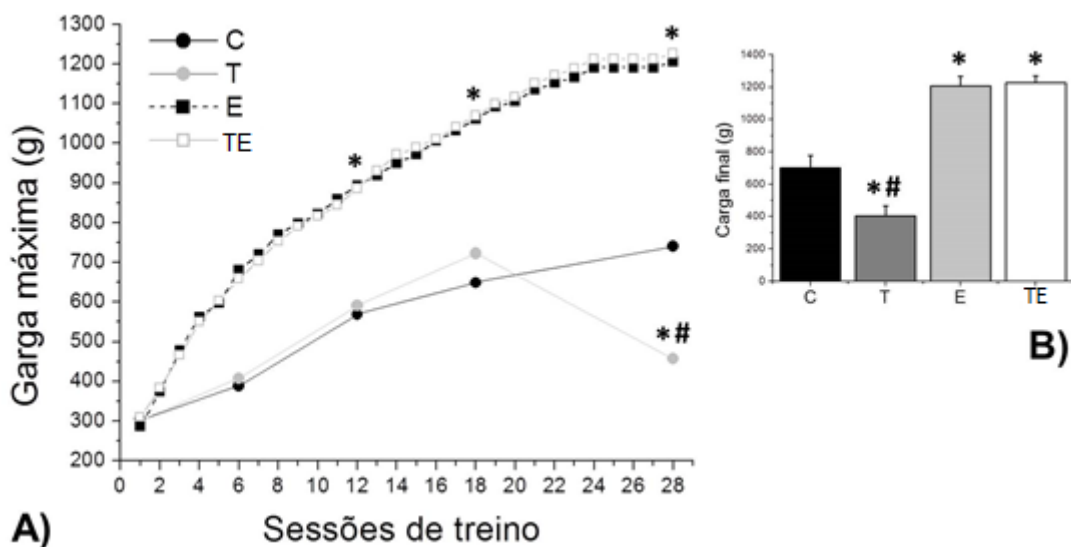
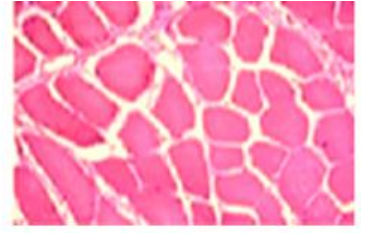
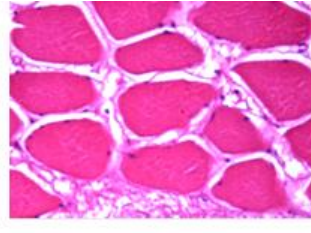
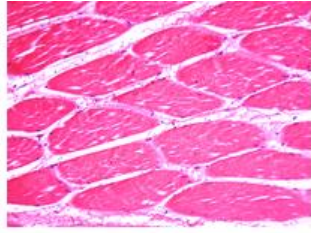
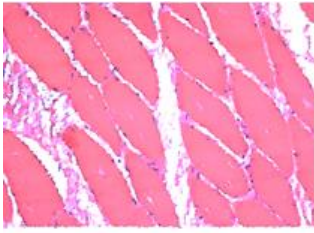


Figura 4. (A) Evolução da carga máxima (g) alcançada nas 28 sessões de treinamento resistido e (B) carga máxima (g) ao final de 28 sessões de treinamento resistido para os animais dos grupos controle (C), inoculados com tumor (T), exercitado (E) e inoculados com tumor e exercitado (TE). Dados são apresentados em média e desvio padrão. * apresenta diferença significativa em relação ao grupo C; # apresenta diferença significativa em relação aos grupos E e ET ($P < 0,05$, ANOVA *one-way* seguido de teste *post-test* de *Tukey*)

Com objetivo de avaliar a área de secção transversa do músculo gastrocnêmio, foi realizado a quantificação de fibras em todos os campos fotografados dos grupos (C= 3, T= 4, E= 3 e TE= 4). Na figura 5 é apresentado a imagem da área de secção transversa de cada grupo e abaixo o número de ocorrência do tamanho da fibra muscular. Foi observado que o grupo tumor apresenta o percentil 75 no valor de 9042 (μm^2), enquanto o controle apresenta o percentil 75 no valor de 30406 (μm^2).



Média	23742	Média	5867	Média	17348	Média	6661
Percentil 75	30406	Percentil 75	9042	Percentil 75	21012	Percentil 75	12553
Mínimo	746	Mínimo	642	Mínimo	456	Mínimo	433
Máximo	67367	Máximo	53594	Máximo	69713	Máximo	56594

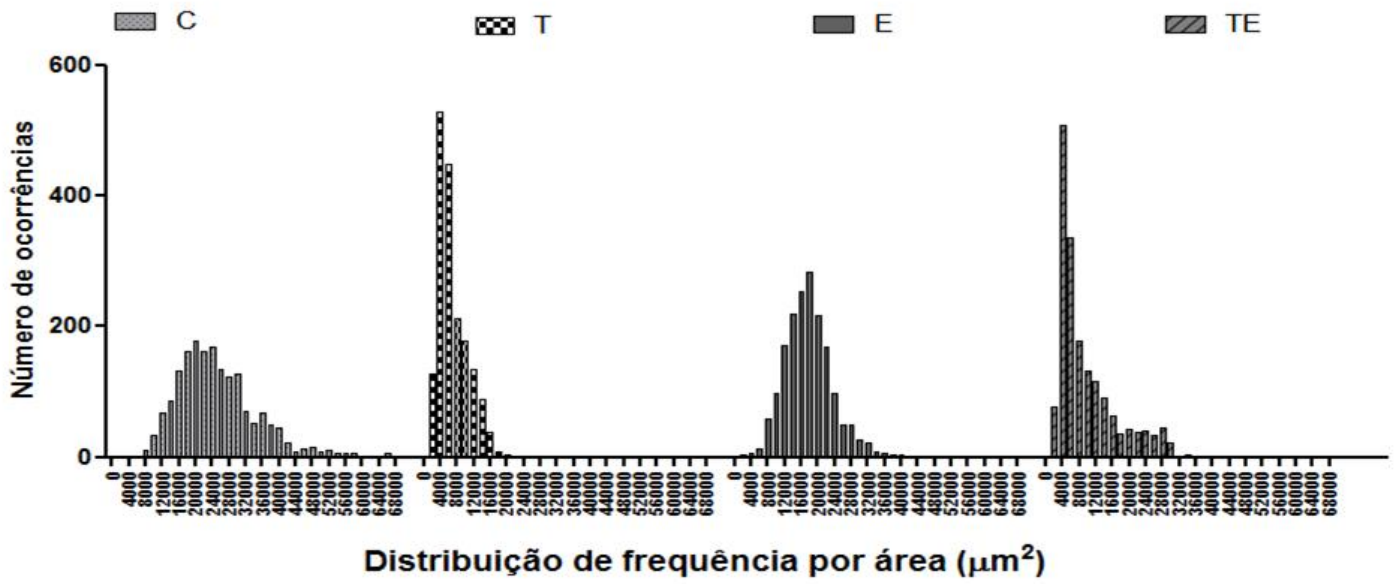


Figura 5. Histologia: Imagem da área de secção transversa do músculo gastrocnêmio de cada grupo, valores da média, percentil 75%, mínimo e máximo. Número de ocorrências distribuídos em classes.

Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos nos marcadores antioxidantes analisados: TRAP, GSH e Catalase (Tabela 2). No entanto, foi observado aumento no marcador de lipoperoxidação induzida por hidroperóxido no grupo TE quando comparado com o controle.

Tabela 2. Marcadores de estresse oxidativo determinados no músculo gastrocnêmio dos animais dos grupos controle (C), inoculados com tumor (T), exercitado (E) e inoculados com tumor e exercitado (TE).

	C (n = 9)	T (n = 9)	E (n = 9)	TE (n = 10)
AOPP (µmol/L cloramina-T)	9,32 ± 3,5	9,23 ± 2,9	10 ± 2,7	9,5 ± 2,2
QL (área sob a curva)	13280 ± 7378 ^a	17883 ± 8301 ^a	14044 ± 7111 ^a	24392 ± 10040 ^b
TRAP (µmol trolox)	0,49 ± 0,1	0,51 ± 0,1	0,52 ± 0,1	0,50 ± 0,1
GSH (mmol/g)	6,98 ± 0,6	7,35 ± 1	7,42 ± 1,4	7,98 ± 1,3
Catalase (U/g)	0,013 ± 0,005	0,012 ± 0,002	0,013 ± 0,004	0,013 ± 0,004

Dados são apresentados em média e desvio padrão. a,b letras diferentes na mesma linha apontam diferença significativa entre os grupos ($P < 0,05$, ANOVA *one-way* seguido de teste *post-test* de *Tukey*).

A expressão gênica de TNF- α no músculo flexor longo do halux foi similar aos grupos, não apresentando diferença significativa entre eles. O resultado está apresentado na figura 6 em média e desvio padrão.

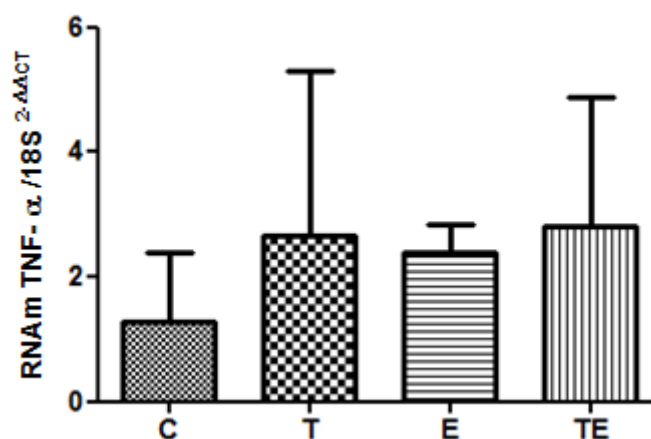


Figura 6. Expressão gênica de TNF- α no músculo flexor longo do hallux dos animais dos grupos controle (C), inoculados com tumor (T), exercitado (E) e inoculados com tumor e exercitado (TE). Dados são apresentados em média e desvio padrão.

No sentido de avaliar a ativação ou inibição de síntese e degradação de proteínas através da transcrição de RNAm, não foi observado diferença significativa quando analisado a transcrição de degradação de proteínas através do marcador FXBO-32. Contudo, foi possível observar uma diminuição significativa $p=0,01$ de MTOR no T e TE quando comparados com o controle. Os resultados estão presentes na figura 4.

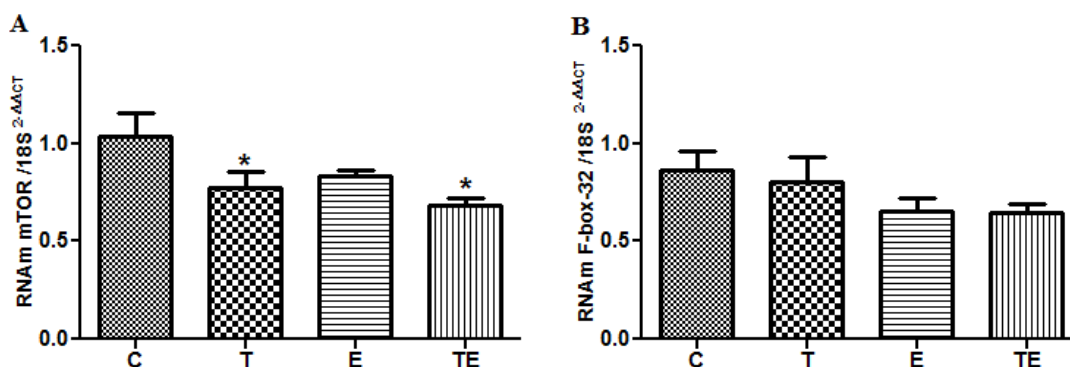


Figura 7. Expressão gênica de mTOR e FXBO-32. Dados são apresentados em média e desvio padrão. * apresenta diferença significativa em relação ao grupo C ($P < 0,05$, ANOVA *one-way* seguido de teste *post-test* de *Tukey*)

8 DISCUSSÃO

De acordo com a literatura, acredita-se que esse trabalho seja pioneiro ao investigar o efeito do ER na modulação da caquexia do câncer e a contribuição do estresse oxidativo e vias sinalizadoras de degradação e síntese de proteínas nesse processo. Os principais resultados encontrados foram: a implantação do tumor de Walker-256 promoveu acentuada redução do peso corporal, redução da área de secção transversa e perda de força muscular, além de diminuir da expressão gênica da mTOR nos animais inoculados com

tumor em relação aos controles; em contrapartida, o ER foi capaz de atenuar a perda de peso corporal e a atrofia muscular causada pela implantação do tumor; tal efeito contribuiu para prevenção da perda de força muscular nos animais implantados com tumor que realizaram exercício; no entanto, essas modulações citadas acima não estão associadas ao estresse oxidativo.

O presente trabalho corrobora com os achados da literatura (Bacurau *et al.*, 2007; De Lima *et al.*, 2008; De Lima *et al.*, 2011; Donatto *et al.*, 2013), onde o ER preservou a perda de força nos animais inoculados com o tumor de Walker-256 durante 12 dias com relação aos animais que realizaram o programa de ER livre da inoculação do tumor. Em contrapartida, os animais sedentários apresentaram redução acentuada da força muscular. A força muscular é um importante indicador de saúde e longevidade, devido sua importância para pacientes com câncer acometidos com a caquexia, principalmente, a estreita relação deste componente com a mobilidade e função do sistema locomotor (Fearon, Glass e Guttridge, 2012). Além disso, o crescimento do tumor exige energia do hospedeiro, geralmente proveniente do tecido muscular e adiposo. A perda de peso pode ser ainda acentuada devida a diminuição de ingestão calórica ou aumento do dispêndio energético ou a combinação de ambos (Argilés *et al.*, 2014). Nesse sentido, a preservação do tecido muscular e adiposo é essencial para manutenção do equilíbrio metabólico e melhora na qualidade de vida dos pacientes com câncer (Argilés, López-Soriano e Busquets, 2013). Estudos têm demonstrado que o exercício físico pode contribuir para a preservação da massa corporal e prevenção da perda de peso em ratos portadores de tumor de Walker-256 (Bacurau *et al.*, 2007; De Lima *et al.*, 2008; De Lima *et al.*, 2011; Donatto *et al.*, 2013). Fernandes e colaboradores (1994) demonstraram que as células tumorais Walker-256 implantadas em ratos promovem maior produção de lactato e CO₂ proveniente da glicose e CO₂ da glutamina, quando comparado com linfócitos. Essas mudanças metabólicas são induzidas também pelo exercício de alta intensidade, o que pôde explicar o menor crescimento do tumor no estudo desses autores (Fernandes, Marques-Da-Costa e Curi, 1994). Bacurau e colaboradores (2007) mostraram que animais treinados e implantados com tumor de Walker-256 apresentaram redução significativa no metabolismo da glicose e glutamina quando comparado com os animais implantado com o

tumor não treinado. A redução na produção de energia provinda da glicose foi acompanhada pela redução da atividade da hexokinase (Bacurau *et al.*, 2007).

O tecido adiposo é outro tecido que sofre mudanças metabólicas importantes na caquexia do câncer. Esse tecido contribui consistentemente para a inflamação sistêmica, além de ser o maior órgão endócrino, expressa uma variedade de fatores anti e pró-inflamatório e hormônios (Donatto *et al.*, 2013). Donatto e colaboradores (2013) observaram o efeito positivo do ER e resposta anti-inflamatória em ratos implantados com tumor de Walker-256 nos níveis de interleucina IL-6 no tecido adiposo mesentérico e redução de TNF- α no mesmo tecido. Lima e colaboradores (2011) demonstraram que ratos implantados com o tumor de Walker-256 que participaram do treinamento anaeróbio de natação, apresentaram maior quantidade de células apoptóticas e proliferação celular reduzida. Os autores citados acima também relatam que esses eventos contribuíram para a redução da massa do tumor em ~40%, além de prevenir o peso corporal. Nosso estudo também demonstrou que 8 semanas de ER foram capazes de atenuar a perda de peso corporal, claramente demonstrado pela significativa redução no índice de caquexia (Tabela 1) e a atrofia muscular causada pela implantação do tumor (figura 5). Tais efeitos contribuíram para prevenção da perda de força muscular nos animais implantados com tumor que realizaram ER (Figura 4). Uma vez o tumor implantado, o músculo esquelético é o alvo mais comum, pois nele é armazenado a maior quantidade de proteínas, aminoácidos, além de oferecer energia imediata através do glicogênio muscular. Nesse cenário, o músculo esquelético tem sua capacidade de gerar força diminuída, o que pode aumentar a fadiga; logo, a função muscular e a capacidade de se locomover pode ser comprometida (Ardies, 2002).

O músculo esquelético tem notável plasticidade em resposta das mudanças na demanda energética (Holloszy, 1967). Continuamente é gerado ERO, em especial, o ânion superóxido que é rapidamente formado pela redução univalente do oxigênio e produzido naturalmente em baixa quantidade sem a ativação contrátil e durante a atividade contrátil é drasticamente aumentado (Reid *et al.*, 2005). Essa observação tem sido pautada na possibilidade das ERO contribuir na adaptação e fadiga muscular (Powers *et al.*, 2010), regulação do estado redox celular (Janssen-Heininger *et al.*, 2008) e

participarem como mensageiros na regulação gênica (Allen, Kabbara e Westerblad, 2002). Os resultados do presente estudo, não demonstraram mudanças nos marcadores de estresse oxidativo analisados no músculo gastrocnêmio. Todavia, os estudos que foram embasados para nossa hipótese apontam que a geração de RL e ERO favorecem a diminuição de proteólise (Guarnier *et al.*, 2010) e são alvos terapêuticos para o tratamento de perda de massa muscular (Arthur, Grounds e Shavlakadze, 2008). Diante desse pressuposto, Peternelj e colaboradores (2015) investigaram o efeito do exercício agudo e da depleção da glutathiona induzida pelo tratamento de dietilmaleato (DEM) sobre a expressão gênica de O-GlcNAc, molécula responsável pelo dano da proteína muscular. Esses autores encontraram aumento da expressão de O-GlcNAc após o exercício agudo e administração de DEM e concluíram que o estado redox celular pode ser importante regulador da degradação proteica (Peternelj *et al.*, 2015).

O ER é um potente estimulador para aumentar a síntese muscular (Hartman, Moore e Phillips, 2006), e esse aumento é explicado por alguns mecanismos. Um dos mecanismos envolvido é o aumento da síntese de proteína e/ou diminuição da degradação de proteínas (Gordon, Green e Goggin, 2005; Gould *et al.*, 2013; Biolo, Cederholm e Muscaritoli, 2014; Penna, Baccino e Costelli, 2014). A proteína alvo de rapamicina mamário (mTOR) exerce papel crucial para coordenar sinais de crescimento celular e disponibilidade nutricional para a síntese macromolecular de proteína, lipídios e ácido nucleico. Macedo e colaboradores (2014) investigaram o efeito protetor do ER de baixa intensidade em ratos tratados com dexametasona para indução da atrofia, especificamente no músculo flexor longo do halux. Utilizando protocolo de treinamento resistido por meio do aparato de escada como descreve Hornberger e Farrar (2004), durante 8 semanas os ratos foram treinados em uma intensidade de 60% da capacidade da carga máxima carregada. Os autores observaram redução do peso corporal após o tratamento com dexametasona, quando avaliado a sinalização de síntese de proteína por meio da mTOR no músculo flexor longo do halux foi encontrado o aumento da quantidade de mTOR no grupo treinamento controle e treinamento tratado com dexametasona com a concomitante diminuição da quantidade de atrogin-1 nos mesmos grupos. Os autores concluem que, o treinamento

resistido de baixa intensidade (60%) foi capaz de minimizar a atrofia do músculo flexor longo do halux em ratos tratados com dexametasona para indução de atrofia, a resposta atrofica foi associada com o aumento de atrogin-1 e diminuição dos níveis da proteína Akt. No entanto, o treinamento resistido diminuiu os níveis de atrogin-1 e aumentou os níveis da proteína mTOR especificamente no músculo flexor longo do halux que é altamente recrutado pelo protocolo empregado pelos autores (Macedo *et al.*, 2014). Os dados do presente estudo demonstraram que diminuição da expressão da proteína MTOR no grupo tumor com relação ao grupo controle; entretanto, o ER não foi capaz de aumentar a expressão de mTOR no grupo TE em relação ao T. Além disso, o grupo TE apresentou diminuição de 12% na expressão do marcador de degradação proteica FXBO-32. Esses conjuntos de dados demonstram que o ER não foi capaz de promover o aumento da síntese de proteína e manter a massa muscular nos animais inoculados com tumor e exercitados; a redução na expressão de FXBO-32 é um indicativo que o ER pode inibir a degradação de proteína induzida pelo câncer.

Algumas limitações do presente estudo precisam ser consideradas. Uma das variáveis que podem interferir na intensidade de treinamento é o tempo de subida do animal no segmento da escada, que não foi recordado. Esses dados poderiam servir como parâmetro para melhor controle de trabalho muscular.

CONCLUSÃO

Através dos resultados obtidos, é possível concluir que a implantação do tumor de Walker-256 promove acentuada redução do peso corporal, atrofia muscular e perda de força muscular, nos animais do grupo tumor em relação aos controles; tais prejuízos estão associados à diminuição da expressão gênica da mTOR. Em contrapartida, o exercício resistido é capaz de atenuar a perda de peso corporal e a atrofia muscular causada pela implantação do tumor, efeito esse que contribui de forma significativa para prevenção da perda de força muscular nos animais implantados com tumor que realizaram exercício.

REFERÊNCIAS

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol**, v. 105, p. 121-6, 1984. ISSN 0076-6879 (Print)

0076-6879 (Linking).

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. ISSN 1099-8004.

ALLEN, D. G.; KABBARA, A. A.; WESTERBLAD, H. Muscle fatigue: the role of intracellular calcium stores. **Can J Appl Physiol**, v. 27, n. 1, p. 83-96, Feb 2002. ISSN 1066-7814.

ARDIES, C. M. Exercise, cachexia, and cancer therapy: a molecular rationale. **NutrCancer**, v. 42, n. 2, p. 143-57, 2002. ISSN 0163-5581.

ARGILÉS, J. M. et al. Molecular mechanisms involved in muscle wasting in cancer and ageing: cachexia versus sarcopenia. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 37, n. 5, p. 1084-104, May 2005. ISSN 1357-2725.

ARGILÉS, J. M. Cachexia: a problem of energetic inefficiency. **J Cachexia Sarcopenia Muscle**, v. 5, n. 4, p. 279-86, Dec 2014. ISSN 2190-5991.

ARGILÉS, J. M.; LÓPEZ-SORIANO, F. J.; BUSQUETS, S. Mechanisms and treatment of cancer cachexia. **Nutr Metab Cardiovasc Dis**, v. 23 Suppl 1, p. S19-24, Dec 2013. ISSN 1590-3729.

ARTHUR, P. G.; GROUNDS, M. D.; SHAVLAKADZE, T. Oxidative stress as a therapeutic target during muscle wasting: considering the complex interactions. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v. 11, n. 4, p. 408-16, Jul 2008. ISSN 1363-1950.

BACURAU, A. V. et al. Effect of a high-intensity exercise training on the metabolism and function of macrophages and lymphocytes of walker 256 tumor bearing rats. In: (Ed.). **Exp Biol Med (Maywood)**. United States, v.232, 2007. p.1289-99. ISBN 1535-3702 (Print) 1535-3699 (Linking).

BIOLO, G.; CEDERHOLM, T.; MUSCARITOLI, M. Muscle contractile and metabolic dysfunction is a common feature of sarcopenia of aging and chronic diseases: from sarcopenic obesity to cachexia. **Clin Nutr**, v. 33, n. 5, p. 737-48, Oct 2014. ISSN 1532-1983.

BUCK, M.; CHOJKIER, M. Muscle wasting and dedifferentiation induced by oxidative stress in a murine model of cachexia is prevented by inhibitors of nitric

oxide synthesis and antioxidants. **Embo Journal**, v. 15, n. 8, p. 1753-1765, Apr 15 1996. ISSN 0261-4189.

BURNHAM, T. R.; WILCOX, A. Effects of exercise on physiological and psychological variables in cancer survivors. **Med Sci Sports Exerc**, v. 34, n. 12, p. 1863-7, Dec 2002. ISSN 0195-9131.

CORMIE, P.; MCGUIGAN, M. R.; NEWTON, R. U. Influence of strength on magnitude and mechanisms of adaptation to power training. **MedSci Sports Exerc**, v. 42, n. 8, p. 1566-81, Aug 2010. ISSN 1530-0315.

COURNEYA, K. S. Exercise in cancer survivors: an overview of research. **Med Sci Sports Exerc**, v. 35, n. 11, p. 1846-52, Nov 2003. ISSN 0195-9131.

DAVIES, K. J.; PACKER, L.; BROOKS, G. A. Exercise bioenergetics following sprint training. **Arch Biochem Biophys**, v. 215, n. 1, p. 260-5, Apr 1982. ISSN 0003-9861.

DE LIMA, C. et al. Tumor growth reduction in Walker 256 tumor-bearing rats performing anaerobic exercise: participation of Bcl-2, Bax, apoptosis, and peroxidation. **Appl Physiol Nutr Metab**, v. 36, n. 4, p. 533-8, Aug 2011. ISSN 1715-5312.

DE LIMA, C. Anaerobic exercise reduces tumor growth, cancer cachexia and increases macrophage and lymphocyte response in Walker 256 tumor-bearing rats. **Eur J Appl Physiol**, v. 104, n. 6, p. 957-64, Dec 2008. ISSN 1439-6319.

DONATTO, F. F. et al. Resistance exercise modulates lipid plasma profile and cytokine content in the adipose tissue of tumour-bearing rats. **Cytokine**, v. 61, n. 2, p. 426-32, Feb 2013. ISSN 1043-4666.

DURHAM, W. J.; DILLON, E. L.; SHEFFIELD-MOORE, M. Inflammatory burden and amino acid metabolism in cancer cachexia. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v. 12, n. 1, p. 72-7, Jan 2009. ISSN 1473-6519.

EVANS, W. J. et al. Cachexia: a new definition. **ClinNutr**, v. 27, n. 6, p. 793-9, Dec 2008. ISSN 1532-1983.

FARKAS, J. et al. Cachexia as a major public health problem: frequent, costly, and deadly. **J Cachexia Sarcopenia Muscle**, v. 4, n. 3, p. 173-8, Sep 2013. ISSN 2190-5991.

FEARON, K. C. H.; GLASS, D. J.; GUTTRIDGE, D. C. Cancer Cachexia: Mediators, Signaling, and Metabolic Pathways. **Cell Metabolism**, v. 16, n. 2, p. 153-166, Aug 8 2012. ISSN 1550-4131.

FERNANDES, L. C.; MARQUES-DA-COSTA, M. M.; CURI, R. Metabolism of glucose, glutamine and pyruvate in lymphocytes from Walker 256 tumor-bearing rats. **Braz J Med Biol Res**, v. 27, n. 11, p. 2539-43, Nov 1994. ISSN 0100-879X (Print) 0100-879X (Linking).

FLORES, E. A. et al. Infusion of tumor necrosis factor/cachectin promotes muscle catabolism in the rat. A synergistic effect with interleukin 1. **J Clin Invest**, v. 83, n. 5, p. 1614-22, May 1989. ISSN 0021-9738 (Print) 0021-9738 (Linking).

GONZALEZ FLECHA, B.; LLESUY, S.; BOVERIS, A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle. **Free Radic Biol Med**, v. 10, n. 2, p. 93-100, 1991. ISSN 0891-5849 (Print) 0891-5849 (Linking).

GORDON, B. S.; KELLEHER, A. R.; KIMBALL, S. R. Regulation of muscle protein synthesis and the effects of catabolic states. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 45, n. 10, p. 2147-57, Oct 2013. ISSN 1878-5875.

GORDON, J. N.; GREEN, S. R.; GOGGIN, P. M. Cancer cachexia. **QJM**, v. 98, n. 11, p. 779-88, Nov 2005. ISSN 1460-2725.

GOULD, D. W. et al. Cancer cachexia prevention via physical exercise: molecular mechanisms. **J Cachexia Sarcopenia Muscle**, v. 4, n. 2, p. 111-24, Jun 2013. ISSN 2190-5991.

GUARNIER, F. A. et al. Time course of skeletal muscle loss and oxidative stress in rats with Walker 256 solid tumor. **Muscle Nerve**, v. 42, n. 6, p. 950-8, Dec 2010. ISSN 1097-4598.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. **Oxidative Stress: adaptation, damage, repair and death**. 3^a Edition. Free Radicals in Biology in Medicine: 2007.

HARTMAN, J. W.; MOORE, D. R.; PHILLIPS, S. M. Resistance training reduces whole-body protein turnover and improves net protein retention in untrained young males. **Appl Physiol Nutr Metab**, v. 31, n. 5, p. 557-64, Oct 2006. ISSN 1715-5312.

HOLLOSZY, J. O. Biochemical adaptations in muscle. Effects of exercise on mitochondrial oxygen uptake and respiratory enzyme activity in skeletal muscle. **J Biol Chem**, v. 242, n. 9, p. 2278-82, May 1967. ISSN 0021-9258.

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. ISSN 1066-7814.

INUI, A. Cancer anorexia-cachexia syndrome: current issues in research and management. **CA Cancer J Clin**, v. 52, n. 2, p. 72-91, 2002 Mar-Apr 2002. ISSN 0007-9235.

JANSSEN-HEININGER, Y. M. et al. Redox-based regulation of signal transduction: principles, pitfalls, and promises. **Free Radic Biol Med**, v. 45, n. 1, p. 1-17, Jul 2008. ISSN 0891-5849.

JONES, L. W. et al. The lung cancer exercise training study: a randomized trial of aerobic training, resistance training, or both in postsurgical lung cancer patients: rationale and design. **BMC Cancer**, v. 10, p. 155, 2010. ISSN 1471-2407.

KOREKANE, H.; NISHIKAWA, A.; IMAMURA, K. Mechanisms mediating metabolic abnormalities in the livers of Ehrlich ascites tumor-bearing mice. **Arch Biochem Biophys**, v. 412, n. 2, p. 216-22, Apr 15 2003. ISSN 0003-9861 (Print) 0003-9861.

LAWLER, J. M.; SONG, W.; DEMAREE, S. R. Hindlimb unloading increases oxidative stress and disrupts antioxidant capacity in skeletal muscle. **Free Radic Biol Med**, v. 35, n. 1, p. 9-16, Jul 2003. ISSN 0891-5849.

MACEDO, A. G. et al. Low-intensity resistance training attenuates dexamethasone-induced atrophy in the flexor hallucis longus muscle. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v. 143, p. 357-64, Sep 2014. ISSN 1879-1220.

MEDICINE, A. C. O. S. American College of Sports Medicine position stand. Progression models in resistance training for healthy adults. **Med Sci Sports Exerc**, v. 41, n. 3, p. 687-708, Mar 2009. ISSN 1530-0315.

PENNA, F.; BACCINO, F. M.; COSTELLI, P. Coming back: autophagy in cachexia. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v. 17, n. 3, p. 241-6, May 2014. ISSN 1473-6519.

PENNA, F. et al. Muscle atrophy in experimental cancer cachexia: is the IGF-1 signaling pathway involved? **International Journal of Cancer**, v. 127, n. 7, p. 1706-1717, Oct 1 2010. ISSN 0020-7136.

PENNA, F. Muscle Wasting and Impaired Myogenesis in Tumor Bearing Mice Are Prevented by ERK Inhibition. **Plos One**, v. 5, n. 10, Oct 27 2010. ISSN 1932-6203.

PETERNELJ, T. T. et al. Glutathione depletion and acute exercise increase O-GlcNAc protein modification in rat skeletal muscle. **Mol Cell Biochem**, v. 400, n. 1-2, p. 265-75, Feb 2015. ISSN 1573-4919.

PETERSEN, A. M.; PEDERSEN, B. K. The anti-inflammatory effect of exercise. In: (Ed.). **J Appl Physiol (1985)**. United States, v.98, 2005. p.1154-62. ISBN 8750-7587 (Print) 0161-7567 (Linking).

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. ISSN 1469-445X.

RAHMAN, I.; KODE, A.; BISWAS, S. K. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. **Nature Protocols**, v. 1, n. 6, p. 3159-3165, 2006 2006. ISSN 1754-2189.

REED, S. A. et al. Inhibition of FoxO transcriptional activity prevents muscle fiber atrophy during cachexia and induces hypertrophy. **Faseb j**, v. 26, n. 3, p. 987-1000, Mar 2012. ISSN 0892-6638.

REID, M. B. et al. Redox mechanisms of muscle dysfunction in inflammatory disease. **Physical Medicine and Rehabilitation Clinics of North America**, v. 16, n. 4, p. 925-949, 2005.

REPETTO, M. et al. Oxidative stress in blood of HIV infected patients. **Clin Chim Acta**, v. 255, n. 2, p. 107-17, Nov 1996. ISSN 0009-8981.

SAKUMA, K.; YAMAGUCHI, A. Novel intriguing strategies attenuating to sarcopenia. **Journal of Aging Research**, v. 2012, 2012.

SCHIAFFINO, S. et al. Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy. **Febs j**, Mar 21 2013. ISSN 1742-464x.

SEGAL, R. J. et al. Resistance exercise in men receiving androgen deprivation therapy for prostate cancer. **J Clin Oncol**, v. 21, n. 9, p. 1653-9, May 2003. ISSN 0732-183X.

STRASSER, B. et al. Impact of resistance training in cancer survivors: a meta-analysis. **Med Sci Sports Exerc**, v. 45, n. 11, p. 2080-90, Nov 2013. ISSN 1530-0315.

TISDALE, M. J. Loss of skeletal muscle in cancer: biochemical mechanisms. **Front Biosci**, v. 6, p. D164-74, Feb 2001. ISSN 1093-9946.

TISDALE, M. J. Mechanisms of Cancer Cachexia. **Physiological Reviews**, v. 89, n. 2, p. 381-410, Apr 2009. ISSN 0031-9333. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000264815900001 >.

VON HAEHLING, S.; ANKER, S. D. Prevalence, incidence and clinical impact of cachexia: facts and numbers-update 2014. **J Cachexia Sarcopenia Muscle**, v. 5, n. 4, p. 261-3, Dec 2014. ISSN 2190-5991.

WITKO-SARSAT, V. et al. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. **Kidney Int**, v. 49, n. 5, p. 1304-13, May 1996. ISSN 0085-2538.