



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

FERNANDO HENRIQUE BORGES

**ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS, OXIDATIVAS E
FUNCIONAIS DO MÚSCULO CARDÍACO EM RATOS
PORTADORES DE TUMOR DE WALKER-256 E
SUPLEMENTADOS COM CREATINA**

Londrina
2018

FERNANDO HENRIQUE BORGES

**ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS, OXIDATIVAS E
FUNCIONAIS DO MÚSCULO CARDÍACO EM RATOS
PORTADORES DE TUMOR DE WALKER-256 E
SUPLEMENTADOS COM CREATINA**

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

Orientador: Prof. Dr. Rubens Cecchini

Londrina
2018

FERNANDO HENRIQUE BORGES

**ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS, OXIDATIVAS E FUNCIONAIS DO
MÚSCULO CARDÍACO EM RATOS PORTADORES DE TUMOR DE
WALKER-256 E SUPLEMENTADOS COM CREATINA**

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

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Rubens Cecchini
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof^a. Dr^a. Flávia Alessandra Guarnier
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Eduardo José de Almeida Araujo
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Isaias Dichi
Universidade Estadual de Londrina – UEL

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

Prof^a. Dr^a. Marli Cardoso Martins Pinge
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 23 de Março de 2018.

BORGES, Fernando Henrique. **Alterações hematológicas, oxidativas e funcionais do músculo cardíaco em ratos portadores de tumor de Walker-256 e suplementados com creatina**. 2018. 94 f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

RESUMO

A caquexia do câncer é uma doença caracterizada pela perda progressiva de massa corporal, não envolvendo apenas a musculatura esquelética, mas também a cardíaca. Embora existam relatos de perda de massa muscular cardíaca em ratos portadores de tumor, até o momento existem poucas relações entre estresse oxidativo e caquexia cardíaca, sendo que, diversas estratégias vem sendo estudadas afim de reverter o quadro da caquexia cardíaca. Desde o século passado a creatina passou a ser utilizada como suplementação em diversas doenças cardiovasculares e, apresentou efeitos promissores. Entretanto, ainda não se descreveu o efeito desta suplementação sobre a caquexia cardíaca induzida pelo câncer. Por essa razão, o objetivo desse trabalho foi investigar o efeito da suplementação com creatina durante o desenvolvimento tumoral em animais portadores da forma sólida do tumor de Walker-256. Para isso, ratos Wistar machos foram divididos em 5 grupos: controle (C), tumor (T – inoculados com $8,0 \times 10^7$ células viáveis em 300 μ L de PBS, intramuscularmente no flanco direito), tumor suplementado com creatina (TCr – inoculação do tumor + creatina diluída em água mineral – 8g/L). Os animais do grupo T e TCr foram acompanhados em dois tempos experimentais distintos, 5 e 10 dias, dessa forma, os 5 grupos experimentais foram: C, T5 e TCr5 (acompanhados durante 5 dias) e T10 e TCr10 (acompanhados durante 10 dias). Os animais foram pesados no início e ao final de cada período experimental e a ingestão alimentar e de água foi controlada a cada 2 dias. Antes da inoculação do tumor e início com a suplementação e antes da eutanásia, os animais foram avaliados através do exame de eletrocardiograma. No dia da eutanásia, os animais foram pesados, anestesiados, e o sangue foi coletado pela veia porta, em seguida, o coração, este separado entre ventrículos e átrios – ambos em direito e esquerdo –, o músculo gastrocnêmio e o tumor. A perda de peso corporal foi calculada através da diferença entre o peso final e o peso inicial, assim como a perda de musculatura esquelética, representada pelo músculo gastrocnêmio, e cardíaca em ambos ventrículos. A amostra de sangue foi utilizada para realização do hemograma, quantificação de glicose, AOPP, malondialdeído e TNF- α . Para o coração, quantificou-se creatina, creatinofosfato e creatina livre, apresentando aumento da concentração nos grupos suplementados, espessura da parede ventricular por morfometria, perfil elétrico por eletrocardiograma, quantificação de cálcio no tecido, atividades proteossomal e de calpains, peroxidação lipídica, proteínas carboniladas e produtos reativos ao ácido tiobarbitúrico. Os animais apresentaram perda de peso progressiva durante o desenvolvimento tumoral e diminuição na ingestão alimentar. Ao analisar o sangue, observou-se redução no número de hemácias, aumento de reticulócitos, plaquetas e leucócitos. A glicose sistêmica também reduziu nos animais com tumor, e o estresse oxidativo (lipoperoxidação e carbonilação de proteínas) e a inflamação sistêmica (TNF- α) aumentaram. Ao comparar essas análises com os animais, da qual, ofertou-se a suplementação com creatina, os mesmos parâmetros são semelhantes ao grupo controle. As análises cardíacas nos animais com tumor revelaram diminuição da espessura da parede do ventrículo direito, resultando em ineficácia da repolarização ventricular, aumento do batimento cardíaco e inversão da onda T. Assim, foi capaz de observar aumento da concentração de cálcio no tecido cardíaco e da atividade da calpaina no ventrículo direito. Em teste de estresse oxidativo, ocorreu aumento peroxidação lipídica, carbonilação de proteínas e de malondialdeído nos animais com tumor. Mais uma vez, a suplementação de creatina foi capaz de impedir que algumas alterações ocorressem. Apesar do desenvolvimento tumoral ser capaz de apresentar mudanças importantes no tecido cardíaco, a suplementação com creatina foi capaz de reverter quase todos os parâmetros analisados, apresentando efeitos protetores.

Palavras-chave: Caquexia do câncer. Atrofia cardíaca. Creatina. Coração.

BORGES, Fernando Henrique. **Hematological, oxidative and functional alterations in rats bearing Walker-256 tumor and supplemented with creatine.** 2018. 94 pages. These (PhD in Health Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

ABSTRACT

Cancer cachexia is a disease characterized by progressive loss of body mass, involving not only skeletal muscle, but also cardiac proteins. Although it was related the presence of cardiac muscle mass loss in tumor-bearing rats, there are few researches relating oxidative stress with cardiac cachexia and several strategies have been studied to reverse the cancer-induced cardiac atrophy. Since last century, creatine has been used as supplementation in several cardiovascular diseases and presented promising effects. However, the supplementation effect on cancer-induced cardiac cachexia has not yet been described. Therefore, the objective of this work was to investigate the effect of creatine supplementation during tumor development in animals with Walker-256 tumor solid form. For this, male albino Wistar rats were divided into 5 groups: control (C), tumor (T – $8,0 \times 10^7$ viable cells in $300 \mu\text{L}$ PBS, inoculated intramuscularly in the right flank) and tumor/creatine (TCr – tumor implantation and supplemented with creatine, diluted in mineral water – 8g/L) for 5 and 10 days. Animals of T and TCr groups were followed in two different experimental times, 5 and 10 days, so, the 5 experimental groups were: C, T5 and TCr5 (followed for 5 days) and T10 and TCr10 (followed for 10 days). Animals were weighed in the beginning and in the end of each experimental period, food and water intake were monitored every 2 days. Before tumor inoculation and initiation of creatine supplementation and one day before euthanasia, the animals were evaluated using the electrocardiogram. In the euthanasia day, the animals were weighed, anesthetized and blood were collected through the portal vein, then the heart was removed (and separated into left and right ventricles) and the gastrocnemius muscle and tumor were also collected. Loss of body weight was calculated, as well as loss of skeletal muscle, and cardiac, in the two ventricles. Blood samples were used for complete blood count and quantification of glucose, advanced oxidative protein products (AOPP), malondialdehyde and $\text{TNF-}\alpha$. For heart analysis, creatine, creatine phosphate and free creatine was quantified, as well as the wall thickness of the ventricles, electrical profile, tissue calcium quantification, proteasomal activity, lipid peroxidation, carbonylated proteins and thiobarbituric acid reactive products. Animals showed progressive weight loss during tumor development and decrease in food intake. When blood was analyzed, reduction in the number of available red blood cells was observed and increase in reticulocytes, platelets and leukocytes. Systemic glucose levels decreased and oxidative stress and $\text{TNF-}\alpha$ levels increased. Animals that received creatine supplementation demonstrated similarity with control in several parameters. The cardiac analysis in tumor animals demonstrated reduction in the thickness of the wall in right ventricle, resulting in ineffectiveness of ventricular repolarization, increased heart rate and inversion of T wave. Furthermore, it was also observed an increase of calcium concentration in cardiac tissue and in the calpain activity in right ventricle. Oxidative stress analyses showed increased lipid peroxidation, carbonylation of proteins and malondialdehyde levels. Creatine supplementation was able to prevent most of these changes. Although tumor development was able to induce significant alterations in cardiac tissue, the creatine supplementation was able to reverse almost all analysed parameters, presenting protective effect.

Keywords: Cancer cachexia. Cardiac atrophy. Creatine. Heart.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estágios da caquexia	13
Figura 2 – Eletrocardiografia	20
Figura 3 – Derivações do eletrocardiograma	21
Figura 4 – Traçado do eletrocardiograma em diferentes derivações	21
Figura 5 – Comparação do eletrocardiograma humano e de ratos	22
Figura 6 – Balanço oxidativo	24
Figura 7 – Interação de quinases e fosfatases.....	26
Figura 8 – Atrofia cardíaca na caquexia do câncer	26
Figura 9 – Participação das calpainas no desenvolvimento da caquexia.....	27
Figura 10 – Estresse oxidativo e a ativação do proteassoma no desenvolvimento da caquexia	28
Figura 11 – Esquema da possível atividade da creatina na conversão de ADP em ATP.....	35
Figura 12 – Delineamento experimental.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
AOPP	Produtos avançados da oxidação de proteínas
DDP	Diferença de potencial
DNPH	2,4-dinitrofenil-hidrazina
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
ECG	Eletrocardiograma
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécies reativas de oxigênio
Hb	Hemoglobina
HCl	Ácido clorídrico
HOCl	Ácido hipocloroso
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
I.M.	Intramuscular
IMC	Índice de massa corpórea
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MDA	Malondialdeído
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NAV	Nódulo atrioventricular
NSA	Nódulo sinoatrial
p/v	Peso/volume
RS	Retículo sarcoplásmico
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
v/v	Volume/volume

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	Caquexia – uma breve história da evolução do termo.....	12
1.2	O tumor de Walker-256 no estudo da caquexia do CÂNCER	14
1.3	Atrofia cardíaca durante a caquexia pelo câncer	15
1.4	A estrutura do coração e a avaliação da função cardíaca pelo eletrocardiograma.....	17
1.4.1	Atividade Elétrica cardíaca	18
1.5	Estresse oxidativo e a defesa antioxidante: impacto sobre o controle de massa e da função cardíaca	23
1.6	Relação entre fadiga e anemia em pacientes com câncer	29
1.7	Estresse oxidativo e a defesa antioxidantes – impacto sobre as alterações hematológicas.....	31
1.8	Tratamentos disponíveis para a caquexia pelo câncer	32
1.9	A creatina – perspectiva como tratamento para a síndrome da caquexia	34
2	JUSTIFICATIVA	37
3	OBJETIVO	38
3.1	Objetivos específicos.....	38
4	METODOLOGIA	39
4.1	Animais.....	39
4.2	Manutenção do tumor de Walker-256	39
4.3	Delineamento experimental.....	39
4.4	Eutanásia e coleta de amostras	40
4.5	Análises do tecido sanguíneo.....	41
4.5.1	Hematócrito e Contagem Diferencial de Elementos do Sangue.....	41
4.5.2	Glicemia	41
4.5.3	Quantificação do Níveis de Malondialdeído Plasmático	41
4.5.4	Quantificação de Produtos Avançados da Oxidação de Proteínas no Plasma	42

4.5.5	Quantificação de Fator de Necrose Tumoral Alfa no Plasma.....	42
4.6	Análise do tecido cardíaco	42
4.6.1	Registro Cardiográfico.....	42
4.6.2	Incorporação de Creatina no Tecido Cardíaco.....	42
4.6.3	Morfometria dos ventrículos	43
4.6.4	Quantificação de cálcio no tecido cardíaco	44
4.6.5	Modulação proteolítica no tecido cardíaco	44
4.6.6	Determinação de Estresse Oxidativo no Músculo Cardíaco.....	45
4.6.6.1	Quimiluminescência estimulada por <i>tert</i> -Butil hidroperóxido	45
4.6.6.2	Quantificação de proteínas carboniladas	45
4.6.6.3	Quantificação de produtos reativos ao ácido tiobarbitúrico	46
4.7	Análise estatística.....	46
5	COMENTÁRIOS ADICIONAIS.....	47
	REFERÊNCIAS.....	48
	APÊNDICES.....	57
	APÊNDICE A – Evaluation of creatine supplementation effects in cachexia and hematological parameters in tumor-bearing Walker-256 rats	58
	APÊNDICE B – Time-dependent, proteolytic and contractile modifications in heart and left and right ventricles in cachexia-bearing rats supplemented with creatine	71
	ANEXO.....	93
	ANEXO A – Aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais.....	94

1 1 INTRODUÇÃO

2 1.1 A CAQUEXIA – UMA BREVE HISTÓRIA DA EVOLUÇÃO DO TERMO

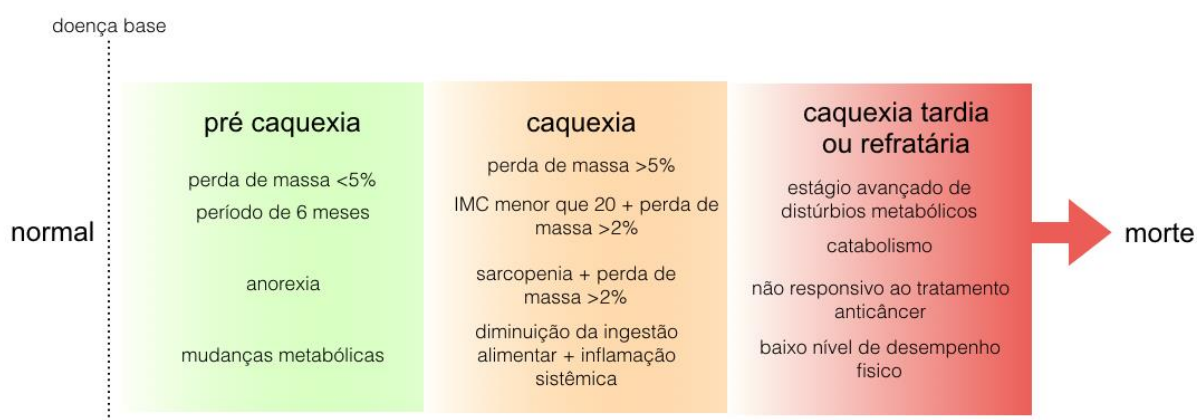
3 A associação entre a deterioração do estado nutricional, a presença de
4 doenças crônicas, diminuição da qualidade de vida e o aumento do risco de
5 morbidade e mortalidade têm sido descrito desde do século III d.C. (NORMAN *et al.*,
6 2008; DOEHNER & ANKER, 2002). Atualmente, sabe-se que a origem dessa
7 deterioração é multifatorial e também que, a relação da perda de peso com o
8 número de internações hospitalares relacionadas a doenças crônicas é alta,
9 subdiagnosticada e subtratada (STRATTON *et al.*, 2004). Essa condição metabólica
10 é na clínica, comumente referida como ‘caquexia’, ‘estado caquético’, ou ‘perda de
11 peso severa’ (MUSCARITOLI *et al.*, 2010) e está presente em diversas doenças,
12 como AIDS, sepse, enfisema pulmonar, artrite, diabetes e câncer (TISDALE, 2002;
13 COSTELLI & BACCINO, 2000).

14 O termo caquexia possui origem grega, derivando das palavras *kakos*
15 (mau) e *hexis* (estado) e é usualmente associado a uma condição de debilidade
16 relacionada a quadros de desnutrição ou acelerada perda de peso, sem causa
17 aparente (LANGSTEN & NORTON, 1991; WALSMITH & ROUBENOFF, 2002),
18 podendo ser definida como “uma síndrome multifatorial caracterizada por perda de
19 peso, gordura e de massa muscular severa, além de aumento do catabolismo
20 proteico devido a uma doença de base” (MUSCARITOLI *et al.*, 2010). Além da perda
21 de peso, a síndrome também é caracterizada por anorexia, alterações do
22 metabolismo energético, estado inflamatório persistente e proteólise muscular. Em
23 2008, a *Society on Cachexia, Sarcopenia and Wasting Disorders* tornou pública a
24 definição clínica de caquexia, estabelecendo-a como um quadro de acelerada perda
25 de peso de no mínimo 5% em um período de 12 meses ou menos, e na presença de
26 uma doença de base, além de 3 dos 5 critérios descritos a seguir (EVANS *et al.*,
27 2008):

- 28 (1) Diminuição de força muscular;
- 29 (2) Fadiga;
- 30 (3) Anorexia;
- 31 (4) Baixo índice de massa livre de gordura (detectada por absorciometria de raios
32 X de dupla energia - DEXA);
- 33 (5) Parâmetros bioquímicos alterados (Proteína C reativa > 5,0 mg/L; IL-6 > 4,0
34 pg/mL; anemia; albumina sérica < 3,2 g/dL).

1 Por um longo período, a caquexia foi reconhecida somente como um
 2 efeito adverso do câncer, estando sempre associada à redução dos níveis de
 3 atividade física (MOSES *et al.*, 2004), redução da tolerância à terapia anticâncer
 4 (BACHMANN *et al.*, 2008) e também da sobrevida (FEARON *et al.*, 2006). Mais do
 5 que em outras doenças, a perda de peso em pacientes com câncer é raramente
 6 reconhecida, tratada ou manejada ativamente (SPIRO *et al.*, 2006), o que também
 7 trouxe a necessidade de uma definição mais precisa da caquexia pelo câncer. Em
 8 2011, um Consenso definiu a caquexia associada ao câncer como perda de peso
 9 maior do que 5% em um período de 6 meses (na ausência de simples diminuição de
 10 ingestão alimentar); ou Índice de Massa Corpórea <20 com perda de peso >2%; ou
 11 índice muscular apendicular consistente com quadro de sarcopenia (homens <7,26
 12 kg/m²; mulheres <5,45 kg/m²) e perda de peso >2%. Ainda, a definição inclui difícil
 13 melhora por suporte nutricional convencional e debilidade funcional progressiva
 14 (FEARON *et al.*, 2011).

15 No mesmo Consenso, uma evolução no conceito de caquexia também foi
 16 inserida, representando uma evolução tanto no diagnóstico, quanto no estudo da
 17 doença. A partir do mesmo, houve uma estratificação da doença, estabelecendo-se
 18 como pré-caquexia a perda de massa de até 5% do peso total associada a quadros
 19 de anorexia; o quadro já definido acima foi classificado como caquexia; e, caquexia
 20 refratária foi estabelecida como um quadro avançado, com a presença de extenso
 21 catabolismo, distúrbios metabólicos, e falta de responsividade à terapia anticâncer
 22 (FEARON *et al.*, 2011). Os estágios da caquexia, definidos de acordo com o
 23 Consenso, encontram-se ilustrados na Figura 1.



24

25 **Figura 1. Estágios da caquexia.** Estágios de desenvolvimento da síndrome caquética estabelecidos
 26 em Consenso. IMC (índice de massa corpórea) = peso (kg) / altura elevado ao quadrado (m²).
 27 Adaptado de FEARON *et al.*, 2011.

28

1 A caquexia, como dito, é uma síndrome multifatorial. A diminuição da
2 expectativa de vida nestes pacientes normalmente está associada ao
3 comprometimento múltiplo de órgãos (TISDALE, 2002; TISDALE, 2004), incluindo o
4 comprometimento de proteínas cardíacas, o que resulta em importantes alterações
5 no desempenho do coração (ARGILÉS *et al.*, 2005). Neste sentido, alguns estudos
6 experimentais apontam a falência cardíaca como uma das principais comorbidades
7 do câncer (COSTELLI *et al.*, 2001; MOORE-CARRASCO *et al.*, 2007; FUKUDA *et*
8 *al.*, 2009; ZOU *et al.*, 2010). Em geral, na população humana, até 65 anos, 0,4 –
9 0,5% do total de mortes estão diretamente relacionadas às doenças do coração. Em
10 populações com a mesma faixa etária acometidas por câncer colorretal, a incidência
11 de mortes aumenta para 5,7% em pacientes com 1 ano após a ressecção do tumor,
12 ou até 13,5% em pacientes com até 30 dias após ressecção eletiva (MAMIDANNA *et*
13 *al.*, 2015). A perda de massa cardíaca tem sido amplamente relatada em outras
14 doenças de base, como na insuficiência renal e na doença pulmonar obstrutiva
15 crônica (DPOC), o que aparece juntamente com o agravamento da debilidade na
16 doença e diminuição na expectativa de vida (HILLAS *et al.*, 2015; SANDERS *et al.*,
17 2016). Um tópico específico sobre a caquexia cardíaca será abordado mais adiante.

18 Cada tumor apresenta quadros diferentes, alguns possuindo evoluções
19 mais brandas e podendo não desenvolver a caquexia. Como a perda de massa está
20 associada a expectativa e condição de vida reduzida, pacientes que apresentam
21 30% de perda de massa geralmente não sobrevivem (TISDALE, 2002).

22

23 1.2 O TUMOR DE WALKER-256 NO ESTUDO DA CAQUEXIA PELO CÂNCER

24 Modelos experimentais para estudo do câncer são inquestionavelmente
25 úteis para o estudo da doença e de suas comorbidades. No entanto, é fundamental
26 que esses modelos, antes de apresentarem qualquer base para estudos pré-
27 clínicos, mimetizem com algum grau de proximidade a condição humana (BALLARÒ
28 *et al.*, 2016). Durante a história, alguns modelos experimentais se mostraram muito
29 bem-sucedidos em representar a síndrome da caquexia, apesar de, individualmente,
30 apresentarem certa limitação. O carcinossarcoma C26, o carcinoma pulmonar de
31 Lewis (LLC), o adenocarcinoma MAC16, e o melanoma B16 representam os
32 modelos mais utilizados em camundongos. O hepatoma ascítico de Yoshida 130
33 (AH 130), e o carcinossarcoma de Walker-256, representam os modelos mais
34 conhecidos em ratos (BALLARÒ *et al.*, 2016).

1 As células de tumor de Walker-256 vêm sendo amplamente utilizadas
2 como modelo experimental para estudo do câncer e de suas comorbidades devido
3 ao seu rápido progresso. Descoberto por George Walker em 1928, em Baltimore, o
4 tumor se caracterizava como um carcinoma mamário, que surgia em ratas prenhas e
5 que, durante o período fértil, desaparecia. As células então foram isoladas e
6 originaram células tumorais de rápido desenvolvimento, que foram repassadas para
7 outros animais por meio de passagens intraperitoneais. As células de carcinoma
8 sofreram modificações, se tornando células típicas de carcinossarcoma, e passaram
9 a ser mantidas por meio de passagens intraperitoneais em diversos laboratórios
10 (EARLE, 1935). Os animais implantados com células de tumor de Walker-256
11 apresentam perda de massa geral entre 10-20% evoluindo até a morte do animal.
12 Em períodos experimentais de até 21 dias, os animais desenvolveram perda de
13 massa magra e de gordura, anorexia e inflamação (BALLARÒ *et al.*, 2016),
14 mimetizando a maior parte das características da síndrome (DE SOUZA *et al.*,
15 2014). A principal limitação no uso das células do tumor de Walker reside na
16 excessiva carga tumoral para inoculação, desenvolvimento e crescimento (BELUZI
17 *et al.*, 2015), e acredita-se que este fato seja o principal fator que leve à curta
18 sobrevivência do animal após o início de boa parte dos experimentos.

19

20 1.3 ATROFIA CARDÍACA DURANTE A CAQUEXIA PELO CÂNCER

21 Como mencionado, parece improvável assumir que o intenso catabolismo
22 proteico que acomete a musculatura acontece exclusivamente neste órgão. O
23 músculo cardíaco possui muitas semelhanças com o músculo esquelético, inclusive
24 no que diz respeito à forma de controle do dispêndio energético e aos sistemas de
25 construção e degradação de proteínas. Assim, nos últimos anos, a atrofia cardíaca,
26 assim como a diminuição da função do coração, também foi apontada como um dos
27 componentes da síndrome da caquexia, envolvidos no prognóstico dos pacientes
28 (MAMIDANNA *et al.*, 2015).

29 Há alguns anos, a literatura aponta a perda de peso e massa muscular
30 como importantes características da insuficiência cardíaca (ANKER & SHARMA,
31 2002). Essa situação passou a ser conhecida e definida como caquexia cardíaca.
32 Quando o quadro de complicação cardíaca está relacionado à presença de um
33 tumor, os termos se confundem. Neste caso, o mais correto é tratar a falência
34 cardíaca relacionada ao desenvolvimento de um câncer como “atrofia cardíaca”

1 (MURPHY, 2015). Pacientes que são diagnosticados com caquexia cardíaca (e aqui
2 se fala na associação de insuficiência cardíaca e perda excessiva de massa
3 muscular) têm expectativa de vida reduzida, e taxa de mortalidade de 50% em 18
4 meses após o diagnóstico, o que vem a ser maior do que a taxa de mortalidade em
5 pacientes portadores de tumores (ANKER & COASTS, 1999).

6 A caquexia cardíaca foi descrita em 1964 por Pittman e Cohen, que a
7 classificaram em dois tipos. A primeira, chamada de clássica, que ocorreria em
8 pacientes com insuficiência cardíaca, e a segunda, nomeada de nosocomial, a que
9 ocorria em pós-operatórios. Em ambas, podia-se observar hipóxia celular, liberação
10 de mediadores inflamatórios, citocinas e possível ativação do sistema neuro-
11 hormonal (FREEMAN & ROUBENOFF, 1994; MUSTAFA & LEVERVE, 2001). A
12 síndrome pode promover diminuição da motilidade gastrointestinal, da capacidade
13 gástrica e anorexia, promovendo má absorção e perda de proteínas entero-
14 hepáticas, resultando em riscos de osteoporose e perda de massa muscular (HIRA
15 TZACA & ULICNY, 1994; FRANÇA, 1988; WITTE *et al.*, 2001). Todos esses fatores
16 parecem ser fundamentais para a progressão da caquexia cardíaca. Como pode ser
17 observado, tanto a caquexia cardíaca quanto a atrofia cardíaca pelo câncer
18 compartilham características comuns.

19 Nos últimos anos, alguns trabalhos vêm estudando a perda de massa
20 cardíaca com a presença de tumor, em modelos experimentais. Em um estudo
21 pioneiro, BARREIRO *et al.* (2005), demonstrou que, o estresse oxidativo e a
22 carbonilação de proteínas estavam associados a caquexia induzida pelo
23 desenvolvimento tumoral em ratos implantados intraperitonealmente com células
24 tumorais de AH-130 Yoshida, apontando também diminuição de 23% da massa
25 muscular cardíaca. MARIN-CORRAL *et al.* (2010), demonstraram que o tumor é
26 capaz de alterar o balanço oxi-redução em diversos músculos, incluindo o cardíaco,
27 induzindo modificações oxidativas em proteínas envolvidas na glicólise, na produção
28 e distribuição de ATP e no metabolismo mitocondrial. BORGES *et al.* (2014)
29 demonstraram que o estresse oxidativo gerado pela presença do tumor parece estar
30 envolvido no processo de perda de massa cardíaca. Além disso, o estresse oxidativo
31 parece afetar diretamente os estímulos proteolíticos, que são diferentes nos
32 ventrículos direito e esquerdo. Maiores detalhes sobre os mecanismos envolvidos
33 nas vias de controle da massa muscular e a relação com o estresse oxidativo
34 encontram-se descritos mais adiante.

1 1.4 A ESTRUTURA DO CORAÇÃO E A AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO CARDÍACA PELO 2 ELETROCARDIOGRAMA

3 O coração é um órgão muscular que se contrai ritmicamente, enquanto
4 bombeia o sangue pelo sistema circulatório. Suas paredes são constituídas por três
5 túnicas: a interna ou endocárdio, a média ou miocárdio, e a externa ou pericárdio. A
6 região central fibrosa do coração, chamada impropriamente de esqueleto fibroso,
7 serve de ponto de apoio para as válvulas, além de ser também o local de origem e
8 inserção das células musculares cardíacas (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004). O
9 coração é ainda dividido em átrios esquerdo e direito, e ventrículos esquerdo e
10 direito. As câmaras são distintas, separadas por septos. Os átrios são câmaras
11 pressóricas de paredes finas que servem como reservatório aos ventrículos. Os
12 ventrículos direito e esquerdo bombeiam sangue para os pulmões e circulação
13 sistêmica, respectivamente (BROOKS & FAHEY, 1984).

14 O miocárdio é a mais espessa das túnicas do coração e consiste de
15 células musculares cardíacas organizadas em camadas que envolvem as câmaras
16 do coração como uma espiral complexa. Um número grande destas camadas se
17 insere no esqueleto cardíaco fibroso. O arranjo destas células musculares é
18 extremamente variado, de modo que mesmo em um corte histológico de uma área
19 pequena são vistas células orientadas em muitas direções (JUNQUEIRA &
20 CARNEIRO, 2004). Nesta estrutura, existem dois tipos de células cardíacas: (1) as
21 contráteis, que constituem a massa miocárdica, e (2) as elétricas, que são
22 constituídas de fibras excitatórias e condutoras, especializadas. As células cardíacas
23 contráteis são as responsáveis pela ação de bomba do coração, enquanto que o
24 tecido elétrico é responsável pela rápida condução de impulsos através do coração
25 (BROOKS & FAHEY, 1984).

26 Tanto o músculo esquelético quanto o cardíaco exibem despolarização
27 elétrica que precede a contração. No entanto, ambos diferem em atividade, de
28 alguma forma. O músculo cardíaco é involuntário. Ao contrário das fibras musculares
29 esqueléticas, as células cardíacas são conectadas em séries regulares e estreitas,
30 de forma que o estímulo de uma única célula resulta no estímulo de todas. As
31 células musculares cardíacas são mais curtas e mantidas unidas pelos discos
32 intercalares, que acabam por servir como limites entre os cardiomiócitos
33 (SILVERTHORN, 2010). Como a resistência entre as células é mínima, o músculo
34 cardíaco pode contrair, primeiramente nos átrios e seguindo para os ventrículos.

1 Assim, enquanto que o princípio do “tudo ou nada” se aplica a uma única unidade
2 motora no músculo esquelético, no músculo cardíaco, o mesmo se aplica ao sincício
3 inteiro (GUYTON, 2017).

4 Algumas células cardíacas possuem ritmicidade intrínseca e podem servir
5 como marca-passo. A maior concentração dessas células autorítmicas se encontra
6 no nodo sinoatrial (NSA), localizado no átrio direito, e que pode ser considerado o
7 marca-passo cardíaco. Ainda, o coração possui um sistema de condução elétrica
8 especializado: uma rede nervosa conecta o NSA ao átrio esquerdo. O sistema de
9 condução neuromuscular dos ventrículos é composto pelo nodo atrioventricular
10 (NAV), pelo feixe atrioventricular, pelos ramos esquerdo e direito do feixe de His, e
11 pelas fibras de Purkinje. Em conjunto, essas estruturas permitem que os impulsos
12 sejam conduzidos mais rápida e uniformemente do que se acontecessem
13 diretamente através do músculo cardíaco (SILVERTHORN, 2010).

14 15 1.4.1 Atividade elétrica cardíaca

16 Considerando toda a rede elétrica construída para o funcionamento do
17 coração, breves aspectos sobre sua atividade elétrica e sobre o eletrocardiograma
18 devem ser lembrados. A sístole e a diástole cardíacas dependem que essa rede
19 elétrica funcione em perfeita consonância, para que a bomba cumpra o seu papel.

20 As células miocárdicas em repouso são polarizadas – ou seja, as células
21 são negativamente carregadas em seu interior e positivamente carregadas em sua
22 superfície. Antes do músculo cardíaco contrair, ele precisa despolarizar, ou seja, o
23 interior se tornar positivamente carregado, e o exterior negativamente carregado. A
24 onda elétrica de despolarização causa contração progressiva do músculo cardíaco.
25 Como essa despolarização acontece rapidamente, os ventrículos se contraem como
26 uma unidade. Desta forma, para acontecer, o ciclo cardíaco envolve despolarização,
27 contração e repolarização em série. O potencial de ação de despolarização estimula
28 a liberação de íons Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático, o que resulta na contração do
29 músculo cardíaco. Depois da sua contração, o músculo se repolariza pela inversão
30 de cargas (e uma nova diferença de potencial) para o seu estado de repouso
31 (BROOKS & FAHEY, 1984).

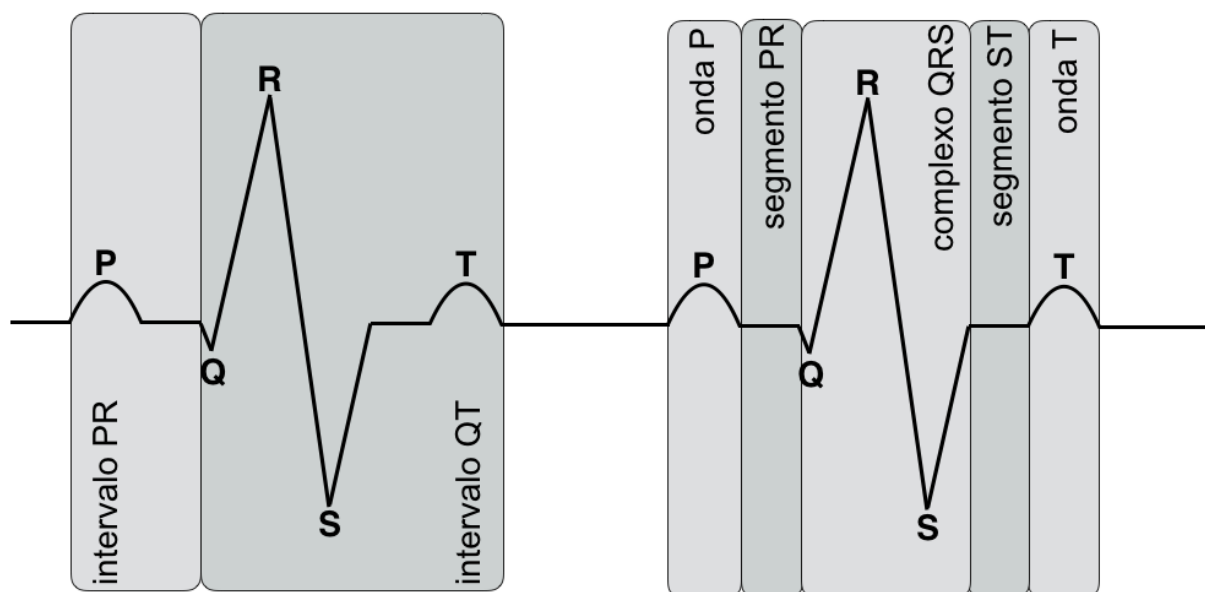
32 Diferenças no potencial de membrana da superfície cardíaca podem ser
33 medidas pela determinação da diferença de potencial entre dois eletrodos colocados
34 na superfície corporal (BROOKS & FAHEY, 1984). A técnica é chamada de

1 eletrocardiografia ou eletrocardiograma (ECG). Desenvolvido por Willem Einthoven
2 no século XIX, o ECG se tornou um grandioso marco no desenvolvimento da
3 cardiologia, sendo possível compreender diversos mecanismos de alterações
4 cardíacas, seja na doença ou na própria função do coração (BOUKENS *et al.*, 2014).

5 Considera-se que os elementos elétricos precedem os eventos mecânicos
6 do ciclo cardíaco, ou seja, a despolarização estimula o miocárdio à contração. No
7 coração normal, todas as fibras contraem praticamente ao mesmo tempo, já que a
8 despolarização ocorre muito rapidamente (GUYTON, 2017). O NSA propaga o
9 impulso elétrico que inicia o ciclo cardíaco. Esse impulso elétrico resulta em uma
10 onda de despolarização através dos átrios cardíacos, que na diferença de potencial
11 apontada no ECG, é identificada como onda P, e que imediatamente precede a
12 contração atrial. O ramo de Buchman, que conduz o potencial de ação do NSA ao
13 átrio esquerdo permite a contração simultânea aos átrios direito e esquerdo
14 (BROOKS & FAHEY, 1984).

15 Um discreto atraso, que ocorre quando a onda de despolarização atrial
16 alcança o NAV, permite que o sangue seja conduzido dos átrios aos ventrículos.
17 Depois deste atraso, o NAV é estimulado, resultando na despolarização dos
18 ventrículos, o que produz o complexo identificado como QRS no registro do ECG.
19 Neste processo, o impulso elétrico corre através do feixe atrioventricular, dos ramos
20 direito e esquerdo do feixe de His, e das fibras de Purkinje. Este sistema permite a
21 estimulação rápida dos ventrículos. A formação do complexo QRS acontece
22 justamente antes da contração dos ventrículos. A repolarização dos átrios é
23 geralmente mascarada pelo complexo QRS, e não pode ser vista no registro do
24 ECG (BOUKENS *et al.*, 2014).

25 A onda T, causada pela diferença de potencial na repolarização dos
26 ventrículos, ocorre imediatamente após a sua contração. O período entre as ondas S
27 e T é chamado de segmento ST, e usualmente apresenta alterações relacionadas
28 ao fluxo sanguíneo no exercício. Há um período refratário após um ciclo cardíaco,
29 identificado como o período na qual o miocárdio é incapaz de exercer contração
30 completa. Uma tentativa de despolarização durante o período refratário resulta em
31 diminuição da força de contração (BROOKS & FAHEY, 1984). Na figura 2 podemos
32 observar a disposição das ondas eletrocardiográficas.



1

2 **Figura 2: Eletrocardiografia.** As ondas refletem a despolarização e repolarização dos átrios e
 3 ventrículos, durante a contração e relaxamento da musculatura cardíaca. Fonte: próprio autor.

4

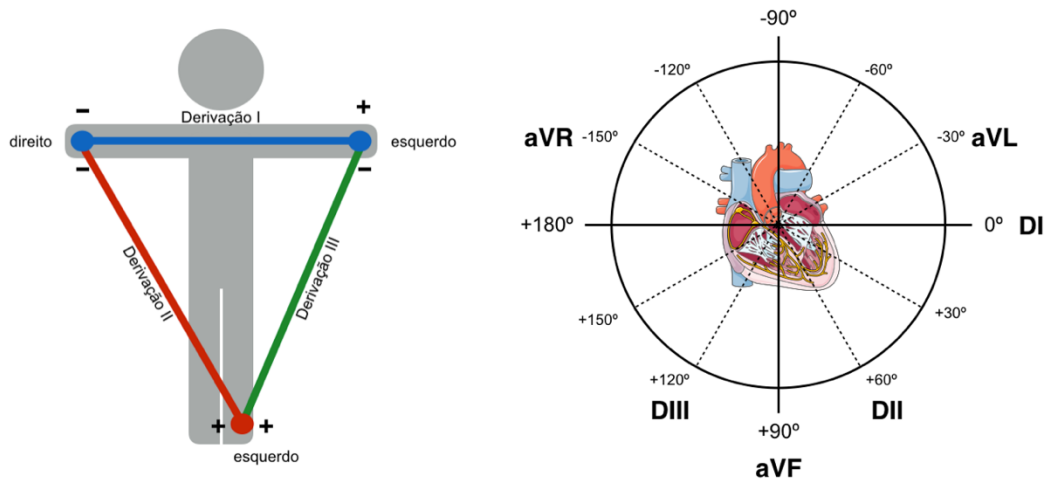
5 Todas as variações elétricas de um ECG são produzidas por diferença de
 6 potencial (DDP). Essas DDP são geradas a partir de diferentes circuitos fechados,
 7 chamados de derivações. O registro mais comum do ECG humano é feito em 12
 8 derivações: 6 periféricas, que podem ser divididas em unipolares ou bipolares (ou de
 9 Einthoven); e 6 precordiais. São nomeadas derivações periféricas as derivações do
 10 ECG obtidas a partir dos eletrodos colocados nos membros, descritas por Einthoven
 11 em 1913 (Figura 3). As derivações bipolares representam a diferença entre dois
 12 eletrodos, e as derivações unipolares registram a diferença de potencial entre um
 13 ponto teórico no centro do triângulo de Einthoven e os eletrodos em cada
 14 extremidade. Ambas as derivações fornecem dados eletrocardiográficos do plano
 15 frontal (não proporcionam dados sobre potenciais dirigidos para a frente ou para
 16 trás). Entre as derivações periféricas, são incluídas:

- 17
- 18 • **D1:** Diferença de potencial entre o braço direito e o braço esquerdo;
 - 19 • **D2:** Diferença de potencial entre o braço direito e a perna esquerda;
 - 20 • **D3:** Diferença de potencial entre o braço esquerdo e a perna esquerda.

21 As derivações unipolares, inicialmente, foram denominadas VR, VL e VF.
 22 A letra V significa *Vector*, e as letras R, L, F significam direita, esquerda e pé (de
 23 *right, left e foot*, em inglês). Posteriormente, foi adicionada a letra a minúscula, que
 24 significa amplificada. As derivações unipolares incluem:

- 24 • **aVR:** Potencial absoluto do braço direito

- 1 • **aVL**: Potencial absoluto do braço esquerdo.
- 2 • **aVF**: Potencial absoluto da perna esquerda.



3
4 **Figura 3. Derivações do eletrocardiograma.** Representação do experimento de Einthoven,
5 demonstrando as derivações periféricas e, logo ao lado, o esquema das derivações unipolares. A
6 figura do coração foi adaptada de FERNANDES, 2017. Fonte: próprio autor.

7
8 As ondas típicas do ECG humano, mostrando as diferenças dos traçados
9 eletrocardiográficos conforme a derivação, se encontram ilustradas na Figura 4.

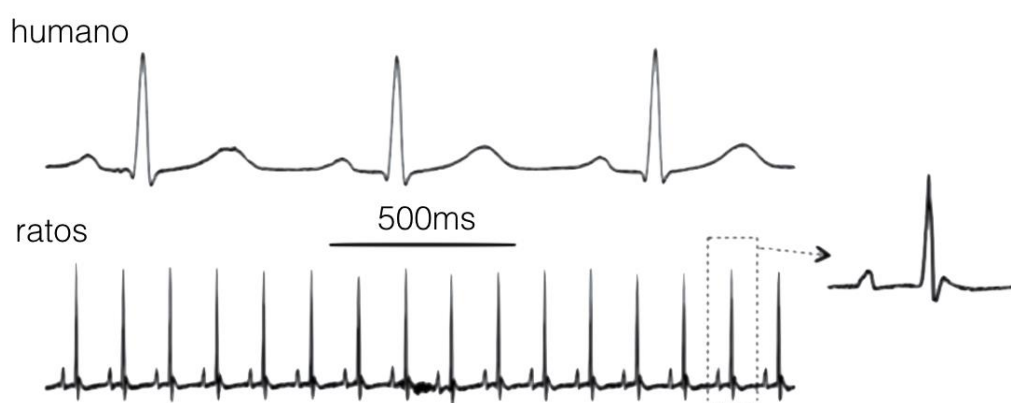


10
11 **Figura 4. Traçado do eletrocardiograma em diferentes derivações.** As derivações representam a
12 tridimensionalidade do coração humano, cada derivação determina uma visão diferente do mesmo
13 estímulo elétrico. Figura adaptada de THALER, 2007.

14
15 No que diz respeito à experimentação animal, desde o início da avaliação
16 do ECG em pequenos roedores, a maior parte dos trabalhos tem sido feita com o
17 objetivo de mostrar os efeitos de vários procedimentos experimentais sobre os
18 registros (LOMBARD, 1952). Nos dias atuais, a situação não é muito diferente. Os
19 equipamentos utilizados sofreram modificações consistentes, sendo hoje sensíveis o
20 suficiente para captar pequenas amplitudes de sinais elétricos, com o mínimo de
21 ruído. Os poucos estudos que tiveram o objetivo de caracterizar os traços
22 eletrocardiográficos de pequenos roedores em situações controle demonstraram que

1 diferentes espécies possuem características distintas quando diferentes derivações
 2 são utilizadas. O eletrocardiograma de mamíferos maiores do que o camundongo
 3 branco se assemelha ao eletrocardiograma humano normal, com algumas pequenas
 4 exceções relacionadas ao tempo do segmento S-T, voltagens menores, e intervalos
 5 mais curtos (LOMBARD, 1952). Uma comparação entre um traçado
 6 eletrocardiográfico humano e de rato encontra-se apresentado na figura 5.

7



8

9 **Figura 5. Comparação do eletrocardiograma humano e de ratos.** Podemos observar maior
 10 frequência de ondas R no rato, quando comparado ao humano, na proporção de 5:1. No humano
 11 podemos notar que o ciclo elétrico total percorre 500ms, enquanto no rato nota-se menor período em
 12 ms para completar um ciclo. Figura adaptada de KAESE *et al.*, 2013.

13

14 Como mencionado, estudos emergentes em animais têm promovido
 15 evidências sobre como a caquexia induzida pelo câncer pode levar ao dano e
 16 diminuição das funções cardíacas. TIAN *et al.* (2010) mostraram que camundongos
 17 com caquexia induzida por carcinoma coloretal C26 apresentam atividade contrátil e
 18 frequência cardíaca diminuídas, o que mostrou estar positivamente correlacionado
 19 com alterações ultraestruturais e atrofia. SPRINGER *et al.* (2014) associaram a
 20 disfunção ventricular avaliada por eletrocardiograma e a mortalidade a partir do 11º
 21 dia de caquexia induzida por hepatoma de Yoshida. Recentemente, TONETO *et al.*
 22 (2016) demonstraram que, 21 dias após a inoculação de células do tumor de
 23 Walker-256, ratos Wistar apresentavam alterações eletrocardiográficas associadas
 24 com ativação de proteólise no coração total. Nesse estudo, o tratamento com
 25 leucina, um aminoácido de cadeia ramificada, foi capaz de minimizar a lesão
 26 cardíaca, a proteólise e melhorar a função cardíaca. Tratamentos que modifiquem o
 27 metabolismo energético ainda são pouco investigados.

28

29

1 1.5 ESTRESSE OXIDATIVO E DEFESA ANTIOXIDANTE: IMPACTO SOBRE O CONTROLE DA MASSA 2 E DA FUNÇÃO CARDÍACA

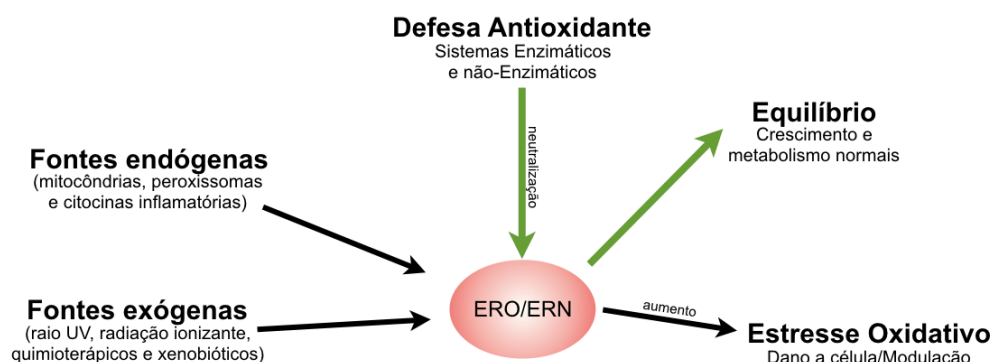
3 Para melhor compreensão do estresse oxidativo, alguns termos precisam
4 ser bem definidos. Em uma ordem crescente de importância, o termo “radical livre”
5 deve ser o primeiro a ser conceituado, seguido por “antioxidante” e “estresse
6 oxidativo”.

7 Radical livre é qualquer espécie capaz de uma existência independente
8 que contenha um ou mais elétrons desemparelhados. Um elétron desemparelhado é
9 aquele que ocupa um orbital atômico ou molecular sozinho (HALLIWELL &
10 GUTTERIDGE, 2007). A presença de um ou mais elétrons desemparelhados muitas
11 vezes torna estas espécies altamente reativas, apesar de esta reatividade ser
12 variável.

13 As fontes de geração intracelular de radicais livres incluem: autooxidação
14 de pequenas moléculas, cadeia de transporte de elétrons, neutrófilos, macrófagos e
15 oxidação do ácido araquidônico presente na membrana plasmática e das
16 hemoproteínas presentes nas membranas do retículo endoplasmático, peroxissomas
17 e fissão homolítica (FREEMAN & CRAPO, 1982; HALLIWELL & GUTTERIDGE,
18 1999; SCHNEIDER & OLIVEIRA, 2004). Como os radicais livres são continuamente
19 formados em pequenas quantidades pelos processos normais do metabolismo,
20 todas as células possuem mecanismos para mitigar seus efeitos agressores,
21 conhecidos como antioxidantes (SCHNEIDER & OLIVEIRA, 2004). A composição
22 das defesas antioxidantes difere de acordo com o tecido e o tipo de célula
23 (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

24 Levando em consideração os conceitos de radicais livres e defesa
25 antioxidante, chegamos ao termo estresse oxidativo, que é utilizado quando o
26 delicado balanço entre produção de radicais livres e defesa antioxidante é quebrado.
27 SIES (1991) definiu o termo como o “distúrbio no balanço pró oxidante/antioxidante,
28 a favor do primeiro, levando à potencial lesão”. HALLIWELL e GUTTERIDGE (2007)
29 definem como “uma lesão de biomoléculas causada por ataque de espécies reativas
30 geradas por constituintes de organismos vivos”. Nem toda lesão causada por
31 estresse oxidativo é lesão oxidativa. Uma lesão oxidativa aumentada pode resultar
32 não somente de estresse oxidativo, mas também de falência nos sistemas de reparo
33 ou substituição. Em princípio, estresse oxidativo pode resultar de: diminuição da
34 capacidade antioxidante, ou aumento na produção de espécies reativas. A

1 correlação entre radicais livres, defesa antioxidante e estresse oxidativo encontra-se
 2 resumida na figura 6. As principais moléculas desencadeadoras do estresse
 3 oxidativo são as espécies reativas de oxigênio (ERO), e as espécies reativas de
 4 nitrogênio (ERN).



5
 6 **Figura 6.** Balanço oxidativo. A figura ilustra algumas fontes que podem gerar ERO em um organismo,
 7 sendo, a barreira antioxidante capaz de neutralizar as ERO de diferentes formas. Caso ocorra o
 8 aumento de espécies reativas e/ou diminuição da barreira antioxidante, devido algum fator, pode
 9 ocorrer o que chamamos de estresse oxidativo, levando a danos celulares e/ou modulação de vias
 10 celulares. As setas em preto indicam o caminho para formação do estresse oxidativo, enquanto as
 11 verdes a ação da barreira antioxidante, gerando equilíbrio. Fonte: próprio autor.

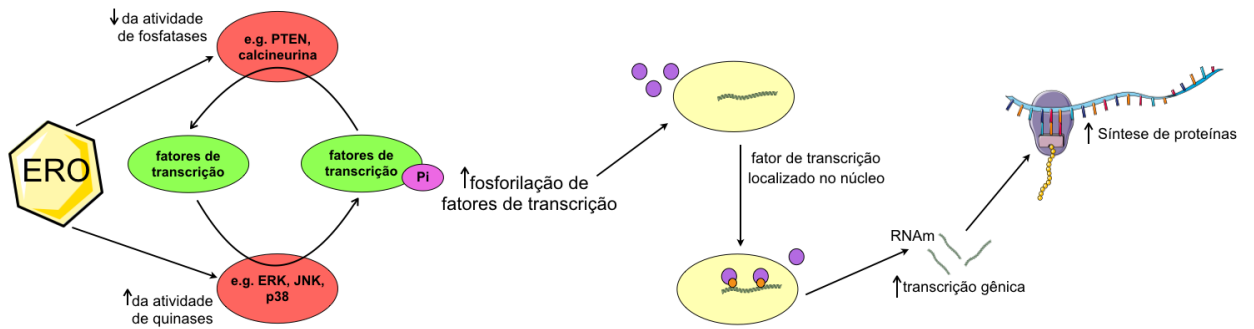
12
 13 Muitos estudos indicam que as ERO são importantes mensageiros das
 14 vias de sinalização, envolvidas na adaptação celular (ALLEN & TRESINI, 2000). Por
 15 outro lado, altas concentrações de radicais livres podem lesar componentes
 16 celulares; níveis baixos a moderados podem desempenhar múltiplas funções
 17 regulatórias em vias de sinalização celular, como o controle da expressão gênica, e
 18 modulação da função do músculo estriado esquelético. A sinalização da expressão
 19 por ERO, contribui para a adaptação de fibras musculares em resposta tanto ao
 20 aumento da atividade contrátil (como no exercício físico), quanto em períodos
 21 prolongados de desuso (como na imobilização). Este paradoxo na sinalização
 22 quanto à função das ERO deve-se provavelmente a diferenças tanto na magnitude,
 23 quanto no padrão temporal da produção de radicais livres (POWERS *et al.*, 2010).
 24 Parece razoável assumir que o mesmo acontece no músculo cardíaco.

25 Pela necessidade de excessiva invasividade na coleta de material
 26 biológico, poucos estudos têm sido realizados em humanos para verificação de
 27 mecanismos que levem à atrofia cardíaca durante o câncer. O conhecimento
 28 adquirido até o presente momento foi conquistado por meio dos modelos animais.
 29 Atualmente, o desequilíbrio no metabolismo de proteínas vem sendo visto como um
 30 dos principais mediadores da atrofia cardíaca em pacientes com câncer (MURPHY

1 *et al.*, 2016). O estresse oxidativo, que resulta da combinação de quimioterapia,
2 consumo antioxidante inadequado e inflamação crônica, acaba por acelerar a
3 falência cardíaca na doença (BELLOUM *et al.*, 2017).

4 O tamanho do coração é governado pelo balanço entre síntese e
5 degradação proteicas. Infelizmente, poucos estudos quantificam diretamente esse
6 balanço, fazendo inferências baseadas no estímulo de síntese e degradação pelas
7 vias de sinalização (MURPHY *et al.*, 2016). Neste sentido, o estresse oxidativo
8 provoca modificação no potencial redox da célula que conduz a mudanças nos
9 padrões de regulação da sinalização da expressão gênica. O que se sabe é que a
10 sinalização redox pode influenciar uma série de ativadores transcricionais, levando
11 às alterações na expressão gênica e mudanças no fenótipo da célula. Estas
12 mudanças seriam específicas para cada tipo celular ou grupo de células. De maneira
13 geral, o principal mecanismo pelo qual a sinalização redox controlaria a expressão
14 gênica seria através do controle das quinases e fosfatases pela
15 fosforilação/desfosforilação de proteínas ou peptídeos responsáveis por sua vez,
16 pelo aumento ou a ativação de fatores de transcrição (CHIARUGI & CIRRI, 2003;
17 TORRES & FORMAN, 2003). Por exemplo, as ERO são conhecidas por ativar o
18 fator de transcrição nuclear κ -B (NF- κ B) (KANDARIAN & JACKMAN, 2006), e isso
19 parece ser fundamental no entendimento da adaptação celular, tanto em estados
20 fisiológicos, quanto patológicos.

21 Uma das mais importantes famílias de proteínas quinase são aquelas
22 ativadas por mitógenos (MAPK, do inglês *mitogen-activated protein kinase*), e que
23 também podem ser ativadas por ERRO. Tais proteínas estão envolvidas na divisão
24 celular e na adaptação celular como no músculo estriado esquelético. Sabe-se que
25 as MAPK desempenham um papel chave na sinalização celular pela ativação ou
26 desativação de proteínas regulatórias, via fosforilação (CUSCHIERI & MAIER, 2005).
27 Estas quinases estão envolvidas, por exemplo, nas decisões de vida e morte
28 celulares em resposta a vários estímulos dentre os quais destacam-se as ERO
29 (MATSUZAWA & ICHIJO, 2005). A figura 7 mostra como as ERO podem interferir no
30 estímulo de síntese de proteínas por meio da interferência nas vias de quinases e
31 fosfatases, além da localização da molécula p38 (que faz parte da via das MAPK) no
32 estímulo.

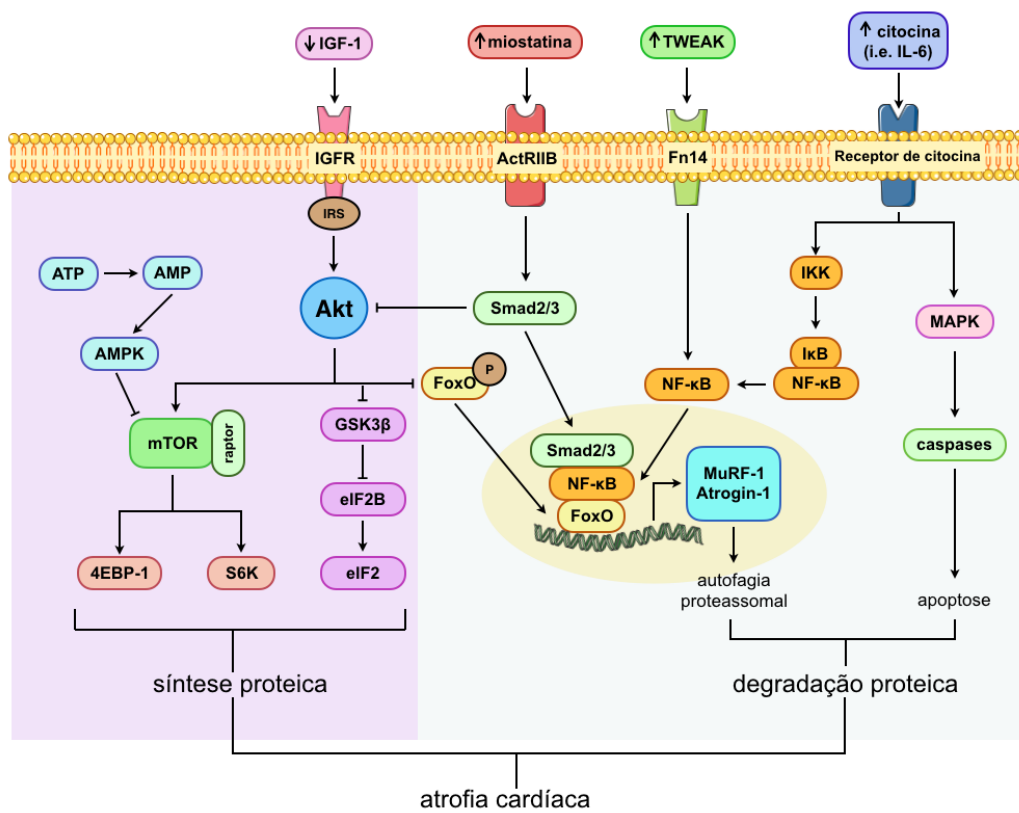


1

2 **Figura 7.** Interação de quinases e fosfatases na indução de síntese e degradação proteica. Ilustração
 3 representativa de como a interação de quinases e fosfatases na regulação dos fatores de transcrição
 4 e subsequente síntese proteica. **Fonte:** Adaptado de POWERS *et al.*, 2010.

5

6 Somente nos últimos anos, estudos vêm se concentrando em como a
 7 caquexia seria responsável pela falência cardíaca no câncer. Os mecanismos
 8 conhecidos até o momento, no que diz respeito especificamente ao que se sabe
 9 sobre o coração no câncer, mostra que, as vias de degração de proteínas funcionais
 10 estão mais ativas, enquanto a de síntese protéica estão diminuídas ou até mesmo
 11 inibidas (MURPHY *et al.*, 2015). Como representado pela figura 8.



12

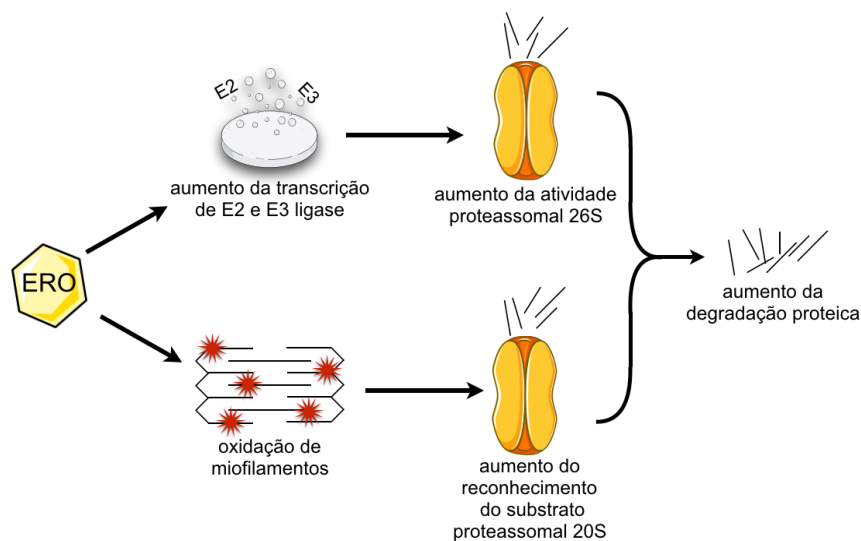
13 **Figura 8.** Atrofia cardíaca na caquexia do câncer. A figura ilustra as possíveis vias de sinalização que
 14 podem contribuir para a atrofia cardíaca durante o desenvolvimento do câncer. Pode-se observar que
 15 as vias de degradação proteica são mais ativadas enquanto as vias de síntese proteica são
 16 diminuídas ou até mesmo inibidas. Adaptado de MURPHY 2015.

1 O estresse oxidativo está fortemante envolvido na ativação das vias de
 2 degradação de proteínas. Uma vez que, a via proteolítica dependente de cálcio (via
 3 das calpaínas) quanto o sistema proteassomal são ativadas por espécies reativas de
 4 oxigênio. As calpains são uma família de proteases celulares que são ativadas pelo
 5 aumento da concentração de cálcio no citosol. O mecanismo do aumento de cálcio
 6 intracelular em casos de atrofia ainda carece de algum esclarecimento. No entanto,
 7 a produção intracelular de ERO desempenha um papel fundamental na homeostasia
 8 intracelular do cálcio (KANDARIAN & STEVENSON, 2002). Calpaínas não
 9 degradam diretamente as proteínas, mas são capazes de promover a clivagem de
 10 proteínas sarcolêmicas (como a titina e a nebulina), responsáveis pelo ancoramento
 11 da parte contrátil muscular, expondo as proteínas contráteis para a degradação
 12 (PURINTRAPIBAN, WANG & FORSBERG, 2003). A Figura 9 ilustra este
 13 mecanismo.



14
 15 **Figura 9.** Participação das calpains no desenvolvimento da caquexia. Apesar das calpaínas não
 16 degradarem diretamente proteínas musculares, é capaz de provocar o desancoramento do miofilamentos
 17 do sarcômero levando a dispersão dessas proteínas a serem degradadas. Adaptado de POWERS *et al.*,
 18 2010.

19 O sistema proteassomal compreende um aglomerado de proteínas de
 20 formato semelhante a um barril, capazes de realizar degradação de outras proteínas,
 21 desde que previamente ubiquitinadas ou oxidadas. O barril proteassomal é dividido
 22 em duas partes principais, uma parte chamada de 26S e outra de 20S (GRUNE *et*
 23 *al.*, 2003). A ubiquitina é uma enzima marcadora que é reconhecida pela porção 26S
 24 do proteassoma; quando uma proteína é marcada através da E2 (enzima
 25 conjugadora) ou E3 (ubiquitina ligase), e imediatamente reconhecida e degradada
 26 em aminoácidos (LI *et al.*, 2003). Contudo, evidências indicam que quando uma
 27 proteína é previamente oxidada, a porção 20S do proteassoma pode reconhecê-la e
 28 degradá-la sem a marcação pelas ubiquitinas (GRUNE & DAVIES, 2003). Alguns
 29 indicativos sugerem que o estresse oxidativo também pode acelerar a degradação
 30 através da ativação exacerbada do barril proteassomal (LI *et al.*, 2003). A Figura 10
 31 ilustra este mecanismo.



1

2 **Figura 10.** Estresse oxidativo e a ativação do proteassoma no desenvolvimento da caquexia. Ação
 3 das espécies reativas do oxigênio na oxidação direta de miofilamentos e aumento da atividade do
 4 barril proteolítico proteassomal. Adaptado de POWERS *et al.*, 2010.

5

6

7 As alterações na estrutura e no metabolismo do músculo cardíaco são
 8 ainda pouco compreendidos (TIAN *et al.*, 2010; SPRINGER *et al.*, 2014),
 9 principalmente no que diz respeito ao controle redox da massa muscular. BORGES
 10 *et al.* (2014), em um modelo de caquexia induzida pela inoculação i.m. do tumor de
 11 Walker-256, demonstraram que o controle da massa cardíaca durante a progressão
 12 do câncer está diretamente relacionado com as atividades proteolíticas dependentes
 13 e não dependentes de cálcio. O estresse oxidativo possui perfil e intensidade
 14 diferentes durante a progressão tumoral. Ainda, os resultados do estudo
 15 demonstraram que o estresse oxidativo parece desempenhar um papel diferente na
 16 modulação das massas dos ventrículos esquerdo e direito, separadamente, já que
 17 as atividades metabólicas são diferentes nas duas câmaras. HINCH *et al.* (2013)
 18 demonstraram desequilíbrio dos sistemas oxidantes/antioxidantes, associado à
 19 expressão aumentada de componentes do sistema proteassomal, no músculo
 20 cardíaco de camundongos *nude* caquéticos. Estudos que avaliem função cardíaca
 21 diante desta estreita relação são ainda mais raros. TONETO *et al.* (2016)
 22 demonstraram que a suplementação com leucina seria capaz de induzir alterações
 23 positivas nos parâmetros eletrocardiográficos de animais portadores do tumor de
 Walker-256.

24

25

1 1.6 RELAÇÃO ENTRE FADIGA E ANEMIA EM PACIENTES COM CÂNCER

2 A perda de massa muscular e a falência cardíaca durante a progressão
3 tumoral, como apresentado, vêm sendo apontados como os principais aceleradores
4 de mortalidade em pacientes com câncer. Naturalmente, tanto a depleção da
5 musculatura esquelética quanto a falência da bomba cardíaca podem ser
6 identificadas como a origem do quadro de fadiga frequentemente apresentado por
7 estes pacientes. Este é um dos sintomas mais comuns no câncer, e também um dos
8 mais negligenciados, ocorrendo em 70-90% dos pacientes, e em 80-100% daqueles
9 que recebem quimioterapia (MOCK & OLSEN, 2003). Ainda, dentre os pacientes
10 que sobrevivem à doença e que experienciaram fadiga, 30-75% relatam
11 continuidade da mesma por meses ou anos após o término do tratamento
12 (ANDRYKOWSKI *et al.*, 1998). Os portadores de câncer descrevem a fadiga como o
13 sintoma mais angustiante da doença, e relatam maior preocupação com este quadro
14 do que com a dor, náusea, ou vômito, que podem ser geralmente aliviados com
15 alguma medicação (VOGELZANG *et al.*, 1997).

16 A causa da fadiga em pacientes com câncer é provavelmente multifatorial
17 (MOCK & OLSEN, 2003). Além da extensa diminuição de massa muscular e
18 cardíaca, a causa da fadiga relacionada ao câncer também pode ser atribuída à
19 anemia que geralmente acompanha quadros de câncer, sendo fácil de se
20 documentar usando a simples quantificação padrão de hemoglobina (Hb) no sangue.
21 Normalmente, define-se como anemia, a diminuição da quantidade de eritrócitos ou
22 de hemoglobina no sangue, podendo gerar deficiência na capacidade de transporte
23 de oxigênio (BOGLIOLO, 2013). Quando a anemia é de aparecimento lento, os
24 sintomas incluem sensação de fadiga, cansaço, falta de ar ou diminuição da
25 capacidade de realizar exercício físico. Quando é de aparecimento rápido, os
26 sintomas incluem, confusão e sensação de desfalecimento (SCHWARTZ, 2007)

27 A etiologia da anemia no câncer varia com a origem do tumor primário,
28 assim como com a cronicidade da doença (KIM *et al.*, 2014). Os fatores mais
29 importantes que contribuem para a anemia incluem: (1) deficiência de ferro
30 secundária aos frequentes sangramentos ou deficiências nutricionais (DICATO *et al.*,
31 2010); (2) hemólises devidas aos fenômenos imunológicos, ativação da cascata de
32 coagulação ou vasculatura anormal associada à presença do tumor (SHARMA *et al.*,
33 2008); (3) eritropoiese diminuída, secundária à produção inadequada de
34 eritropoietina ou resposta diminuída da medula no que diz respeito à produção de

1 eritropoietina (ADAMSON, 2008); e (4) direta invasão da medula por células
2 tumorais, com ruptura do ambiente eritropoiético. O Instituto Nacional do Câncer
3 define anemia branda de 10-11 g/dL de Hb; anemia moderada, de 8,0-9,9 g/dL de
4 Hb; e anemia severa, a presença de 6,5-7,9 g/dL de Hb (SABBATINI *et al.*, 2003). A
5 anemia de branda a severa é subdiagnosticada e subtratada na população com
6 câncer. Isso ocorre, em parte, provavelmente por não levar à risco de morte. No
7 entanto, estudos têm demonstrado que mesmo anemias de branda a moderada
8 estão relacionadas com a diminuição da qualidade de vida e do estado funcional
9 nesta população, o que poderia também levar à diminuição da sobrevida (GLASPY
10 *et al.*, 1997; DEMETRI *et al.*, 1998; LITTLEWOOD *et al.*, 2001).

11 É importante destacar que um fator que contribui de forma particular para
12 a anemia do câncer é a inflamação, já que a mesma divide muitas das
13 características da anemia por inflamação, como uma meia-vida eritrocitária mais
14 curta, diminuída eritropoiese e desorganização da homeostase sistêmica do ferro
15 (KIM *et al.* 2014). Além do exposto, alguns estudos têm apontado que a presença de
16 hipóxia como desafio para o tumor, em decorrência da anemia, resulta em uma série
17 de efeitos biológicos benéficos para o tumor, como promoção da angiogênese,
18 resistência à apoptose, e resistência à terapias citotóxicas, todas essas levando ao
19 malogro do tratamento (MOCK & OLSEN, 2003). O desenvolvimento tumoral pode
20 levar à supressão da hematopoiese através da infiltração na medula óssea ou até
21 mesmo pela produção de citocinas que levam ao sequestro de ferro ou à redução do
22 amadurecimento de glóbulos vermelhos (HENKE *et al.*, 2003; MACHTAY *et al.*,
23 2007). O aumento do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), está associado à
24 inibição da produção de hemoglobina responsável pela ativação de genes
25 específicos para o amadurecimento de glóbulos vermelhos (WELCH *et al.*, 2004;
26 CHENG *et al.*, 2009).

27 Apesar da alta prevalência da anemia no câncer e de seus efeitos
28 negativos sobre a qualidade de vida e sobrevida dos pacientes, os mecanismos
29 moleculares envolvidos na anemia mediada por excesso de produção de citocinas,
30 com exceção da diminuição da regulação de eritropoietina e deficiência do
31 metabolismo do ferro, são pouco descritos. Ainda, poucos modelos experimentais
32 têm sido desenvolvidos ou aplicados no seu estudo.

33

34

1 1.7 ESTRESSE OXIDATIVO E DEFESA ANTIOXIDANTE – IMPACTO SOBRE AS ALTERAÇÕES 2 HEMATOLÓGICAS

3 As alterações hematopoiéticas relacionadas à inflamação, estresse
4 oxidativo e anemia, não são eventos extensamente estudados na literatura. Uma
5 das maiores proteínas nos eritrócitos é a peroxidoxina ácida, que possui um papel
6 fundamental na resposta contra o estresse oxidativo (MORCEAU *et al.*, 2009). A
7 expressão desta proteína é induzida precocemente durante a eritropoiese, antes da
8 produção de hemoglobina, sugerindo a importância da proteção de células
9 progenitoras contra o estresse oxidativo (RABILLOUD *et al.*, 2001). Nos últimos
10 anos, a regulação da eritropoiese mostrou ser realmente sensível ao estresse
11 oxidativo e a liberação de citocinas pró-inflamatórias em pacientes portadores de
12 câncer, assim como em doenças inflamatórias crônicas, são frequentemente
13 associadas com o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, como o
14 peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e o radical hidroxil (OH[•]) (MANTOVANI *et al.*, 2002).
15 Além disso, a principal citocina apontada como a ligação entre a inflamação e a
16 carcinogênese, via estresse oxidativo, vem sendo o TNF-α (BABBAR & CASERO
17 JR, 2006). Alguns estudos demonstram que a elevação do TNF-α, promove
18 concomitante elevação de ERO em células de glioma (TEWARI *et al.*, 2009). No
19 entanto, parece que este papel do estresse oxidativo é complexo, já que as ERO
20 podem tanto direcionar (SATTLER *et al.*, 1999) como prevenir (MASUTANI, 2000) a
21 diferenciação e proliferação na hematopoiese. GREENWALD (1991), em uma
22 importante revisão sobre o assunto, descreve que o aumento de estresse oxidativo e
23 radicais livres estaria associado à desordens implicadas nos mecanismos de
24 desenvolvimento de anemias consequentes à doenças crônicas. CHENAIS *et al.*
25 (2000) mostraram que o estresse oxidativo gerado por butirato ou antraciclina estaria
26 envolvido como o primeiro passo no processo irreversível de diferenciação do
27 eritrócito. Por outro lado, DALLALIO *et al.* (2003) reportaram que o aumento da
28 concentração de citocinas circulantes mediada pela anemia nas doenças crônicas
29 pode ocorrer pela modulação frente ao estresse oxidativo. ELORZA *et al.* (2008)
30 também demonstraram a importância da eritropoiese mediada por ERO. A produção
31 de algumas proteínas específicas (como por exemplo a UCP – proteína
32 desacopladora, relacionada com translocação de prótons e elétrons do espaço
33 intermembranas para a matriz mitocondrial [RICQUIER, CASTEILLA &
34 BOUILLAUD, 1991]) levaria à diminuição de ânion superóxido mitocondrial, o que

1 interferiria diretamente na diferenciação eritroide. Ainda, a proliferação de células
2 vermelhas apresenta uma correlação positiva com a redução da fosforilação de
3 ERK, conhecida por ser uma via de proliferação celular dependente de ERO (assim
4 como visto no músculo esquelético). Essa relação também é vista no caso de
5 elevada resposta inflamatória, levando ao desenvolvimento de anemia (BAI *et al.*,
6 2005).

7 No que diz respeito à perda de massa muscular ou à anemia, nenhuma
8 terapia tem demonstrado total eficácia na reversão dos parâmetros capazes de
9 induzir a fadiga. Um consenso recente expõe alguns poucos tratamentos em uso
10 (WAITZBERG, *et al.*, 2011).

11

12 1.8 TRATAMENTOS DISPONÍVEIS PARA A CAQUEXIA PELO CÂNCER

13 O Consenso Brasileiro de Caquexia-Anorexia em cuidados Paliativos
14 (2011) preconiza que as melhores opções para o tratamento da síndrome incluem
15 melhora da ingestão alimentar. A maioria dos estudos controlados e randomizados
16 não demonstraram benefícios de intervenção nutricional isolada no ganho de peso e
17 na qualidade de vida. Assim, o tratamento da caquexia passou a ser associado ao
18 uso de grande variedade de agentes farmacológicos. A tabela apresentada abaixo,
19 adaptada do Consenso Brasileiro de 2011, mostra de maneira resumida os
20 principais fármacos utilizados atualmente, procurando demonstrar as ações mais
21 importantes utilizadas e as drogas emergentes no manuseio da síndrome da
22 caquexia, visando a diminuição da fadiga. Dentre as ações de maior evidência,
23 destacam-se:

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

- 1 **Tabela 1.** Medicamentos preconizados no tratamento da caquexia induzida pelo
 2 câncer.

Medicamento	Classificação farmacológica	Mecanismo de ação na caquexia
megestrol	Agente antineoplásico Hormônio Estimulante de apetite	Agente progestacional e anti-inflamatório. Inibidor do neuropeptídeo Y (neuropeptídeo orexigenio) no hipotálamo, modula canais de cálcio no núcleo ventro medial (NVM) do hipotálamo (centro da saciedade). Inibe citocinas pró-inflamatórias IL-1, IL-6 e TNF.
dexametasona	Corticóide Anti-inflamatório hormonal Anti-emético	Inibe proteínas pró-inflamatórias IL-1 e TNF- α que diminuem a ingestão e atuam sobre os receptores anorexígenos como a leptina, o fator de liberação de corticotropina e serotonina. Aumento do nível de neuropeptídeo Y (responsável pelo aumento de apetite).
talidomida	Inibidor da angiogênese Imunomodulador sistêmico Bloqueador de TNF- α	Bloqueador do fator de necrose tumoral (TNF- α)
cipionato de testosterona	Anabolizante esteróides derivados sintéticos	Acumulam proteínas e impedem a perda progressiva de nitrogênio associada a caquexia. Aumento da massa corporal não é persistente. A testosterona liga-se aos receptores androgênicos, sofre modificação para dihidrotestosterona, que também age no receptor androgênico. Sofre depois processo de aromatização para estrógeno. Outros mecanismos incluem efeito anticatabólico por interferir na expressão de receptores glucocorticóides e ainda por alterações de comportamento.
undecanato de testosterona		
undecilato de testosterona		
fenilpropionato de testosterona		
isocaproato de testosterona		
próprionato de testosterona		
decanoato de testosterona		
cloridrato de ciproheptadina	Anti-histamínico piperimídico Antagonista serotoninérgico	Antagonista forte do receptor histamínico H ₁ e importante bloqueador serotoninérgico (5HT) na musculatura lisa, fraca ação anticolinérgica e média atividade como depressor do sistema nervoso central. É efetivo no controle de fenômenos alérgicos em pele, particularmente acompanhado de prurido. Útil em condições como cefaléia e anorexia devido ao bloqueio 5HT. Atua como antagonista serotoninérgico

		no centro do apetite hipotalâmico, com o aumento do apetite.
ibuprofeno	Anti-inflamatório não esteroidal Anti térmico e analgésico	Inibidores da síntese de prostaglandinas. Ibuprofeno, na dose de 400mg, três vezes ao dia diminui os níveis de proteínas de fase aguda, de interleucina-6 e cortisol e normalizou a cinética das proteínas totais corporais em alguns pacientes com câncer colorretal. Em portadores de neoplasia de pâncreas estabilizou o peso e melhorou a qualidade de vida, talvez por diminuição dos gastos energéticos.
indometacina	Anti-inflamatório não esteroidal	A indometacina, na dose de 50mg, duas vezes ao dia, em um extenso estudo com duplo cego, em pacientes com tumores sólidos, obteve impacto no estado geral dos pacientes e na sobrevida geral. Estas medicações podem ter algum papel no tratamento paliativo da febre e da caquexia em pacientes com câncer, apesar dos efeitos colaterais gastrointestinais. Os AINE agem pela inibição da produção de prostaglandinas pelas enzimas COX-1 e COX-2.
celecoxibe	Anti-inflamatório não esteroidal inibidor da COX2	

1 **Fonte:** Baseado em WAITZBERG *et al.*, 2011.

2

3 Como visto, poucas ações apresentam algum nível de evidência no
4 tratamento efetivo da síndrome da caquexia.

5

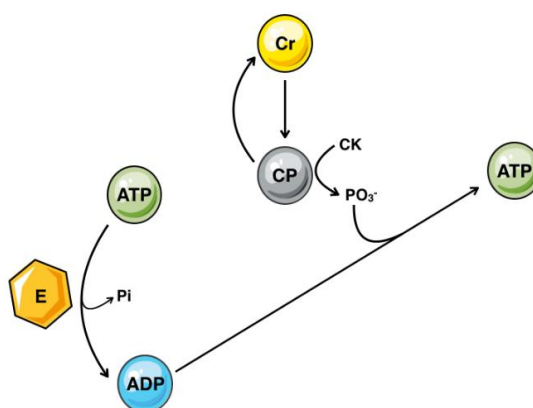
6 1.9 A CREATINA – PERSPECTIVAS COMO TRATAMENTO PARA A SÍNDROME DA CAQUEXIA.

7

8 A creatina foi descoberta em 1832 pelo cientista Michel Eugene Chevreul,
9 que utilizou carne bovina para tentar extrair este componente orgânico. Porém, o
10 processo era caro, e as pesquisas acabaram sendo limitadas. A creatina, ou, ácido
11 2-(carbamimidoil-metil-amino) acético (IUPAC), ou ácido metilguanidino acético,
12 utilizado como suplemento via oral, é absorvido intacto pelo lúmen intestinal indo
13 para a circulação sanguínea (CLARK, 1996). Após a absorção intestinal, a creatina
14 plasmática é levada a vários tecidos corporais, incluindo a musculatura lisa, o
15 cérebro, os testículos e o coração, porém as maiores reservas encontram-se na
musculatura esquelética (CLARK, 1998). Em 1997, GREENHAFF propôs que a

1 entrada da creatina no músculo ocorre ativamente contra um gradiente de
 2 concentração, possivelmente envolvendo a interação da creatina com sítios
 3 específicos na membrana plasmática. A creatina no citoplasma é rapidamente
 4 convertida em creatinofosfato e armazenada para uso como fonte de energia
 5 (CLARK, 1996).

6 O ATP é utilizado como fonte direta de energia liberada a medida que o
 7 fosfato do ATP é removido pela enzima ATPase, resultando em adenosina difosfato
 8 (ADP) e, fosfato inorgânico (Pi). Segundo WYSS e KADDURAH-DAOUK (2000), a
 9 creatina tem como função disponibilizar rapidamente energia, devido a transferência
 10 de um grupamento fosfato da creatinofosfato (CP) para a molécula de ADP,
 11 restaurando a molécula de ATP, através da catalisação da creatina quinase (CK).
 12 Sendo ela também responsável pela transferência de energia a partir da mitocôndria
 13 para o citosol com auxílio de isoformas de CK (CK-MM – músculo esquelético; CK-
 14 MB – coração; CK-BB – cérebro). Assim, o sistema CP-CK auxilia na melhora da
 15 respiração mitocondrial e na relação ATP/ADP (Figura 11), diminuindo a
 16 concentração de ADP. Estudos descrevem a ação antioxidante direta e/ou indireta
 17 da creatina, interferindo na manutenção do pH, através do tamponamento de íons H⁺
 18 e, na ativação da glicogenólise, com melhor disponibilidade de glicose, fornecendo
 19 mais energia. A substância parece ter então, forte influência sobre mudanças
 20 consistentes sobre o fornecimento de energia e poderia influenciar positivamente no
 21 metabolismo energético (WYSS & KADDURAH-DAOUK, 2000).



22

23 **Figura 11.** Esquema da atividade da creatina na conversão de ADP em ATP. Onde, E: energia; ATP:

24 adenina trifosfato; ADP: adenina difosfato; Cr: creatina; CP: creatinofosfato; CK: creatina quinase;

25 PO₃⁻: fosfato. Fonte: próprio autor.

26

27

1 Desde a descoberta da creatina, há crescente interesse dos
2 pesquisadores por seu papel no metabolismo da musculatura esquelética e, a partir
3 deste ponto, muitos estudos passaram a utilizá-la em testes para diversas doenças.
4 TARNOPOLSKY (2000) descreveu em sua revisão um efeito neuroprotetor em
5 animais com doença de Parkinson e Alzheimer, esclerose lateral amiotrófica e após
6 eventos isquêmicos. PERSKY e BRAZEAU (2001), apontam efeitos benéficos em
7 modelos de distrofia muscular de Huntington e Duchenne, alguns distúrbios
8 neuromusculares, doença de McArdle (miopatia metabólica autossômica) além de
9 insuficiência cardíaca congestiva.

10 Inúmeros trabalhos vem sendo publicados sobre os benefícios da creatina
11 sob a forma de suplementação oral, como por exemplo, diminuição na formação de
12 radicais hidroxila (MATTHEWS *et al.*, 1998 e 1999), anion superóxido (LAWLER *et*
13 *al.*, 2002) e também diminuição na concentração de homocisteína (aminoácido
14 sulfurado produzido pela desmetilação da metionina, reage com as lipoproteínas de
15 baixa densidade formando trombos, levando à estreitamento da luz do vaso) no
16 plasma (WYSS & SCHULZE, 2002), demonstrando efeitos antioxidantes diretos e/ou
17 indiretos.

18 Constituída por aminoácidos, a creatina interage como substrato da
19 enzima óxido nítrico sintase, resultando na formação de óxido nítrico, que por sua
20 vez, modula o metabolismo, a contratilidade e o consumo de glicose no músculo
21 esquelético (15). A arginina, um composto formador da creatina, exerce proteção a
22 células endoteliais contra lesões oxidativas causadas por lipoproteínas oxidadas,
23 levando a neutralização do radical superóxido (VERGNANI *et al.*, 2000).

24 No músculo gastrocnêmio, a creatina encontra-se dispersa no
25 sarcoplasma, conferindo proteção ao músculo gastrocnêmio contra a oxidação de
26 ERO durante a atividade física (de GROOF *et al.*, 2002). Relatou-se que a creatina
27 foi capaz de prevenir mutagênese, tanto no DNA nuclear, quanto no DNA
28 mitocondrial em células endoteliais de cordão umbilical humano. Levantando a
29 hipótese de participação na manutenção mitocondrial, tanto no consumo de
30 oxigênio, quando na geração de ATP e sobrevivência celular (GUIDI *et al.*, 2008).

31 TISDALE *et al.* (2010) e STIMPSON *et al.* (2013) demonstraram que a
32 suplementação com creatina seria capaz de reverter a perda de massa no músculo
33 esquelético, emergido como uma terapia promissora em várias condições
34 patológicas (GUALANO *et al.*, 2011), incluindo as doenças cardiovasculares

1 (GORDON *et al.*, 1994; NEUBAUER *et al.*, 1999). Nos últimos anos, esse composto
2 tem recebido considerável atenção devido a inúmeros mecanismos que podem
3 contribuir para tais efeitos benéficos, tais como, aumentar potencial energético das
4 células e preservar glicogênio muscular, efeitos antioxidantes, diminuir níveis
5 musculares de cálcio e reduzir apoptose. (TARNOPOLSKY, 1999; TARNOPOLSKY,
6 2011). Tendo em vista o exposto, e por interferir diretamente sobre a produção de
7 energia, e indiretamente sobre o estresse oxidativo, torna-se razoável supor que a
8 creatina poderia ter efeitos benéficos sobre os processos de desenvolvimento da
9 fadiga durante a progressão da caquexia pelo câncer, interferindo sobre a anemia e
10 também sobre a falência cardíaca em um modelo experimental de caquexia.

11

12 **2 JUSTIFICATIVA**

13 A caquexia, dentre os pacientes com câncer é uma síndrome
14 negligenciada e com poucos resultados terapêuticos realmente eficientes, uma vez
15 que é raramente diagnosticada ou mesmo tratada. Dados clínicos demonstram que o
16 coração é um órgão extensamente comprometido durante a síndrome da caquexia
17 no câncer, apresentando perda de massa e falência funcional, induzindo menor
18 sobrevida e desconforto ao paciente portador. A falência cardíaca, a anemia e o
19 processo inflamatório presentes no paciente com câncer parecem ter influência
20 fundamental no desenvolvimento de fadiga no câncer, que por sua vez, possuem
21 relação igualmente importante com a sobrevida. Recentes evidências demonstram
22 que a perda de massa na caquexia cardíaca possui similaridades com a perda de
23 massa muscular esquelética, promovendo possibilidade de novas alternativas
24 terapêuticas. Apesar de recentes trabalhos demonstrarem relação entre a perda de
25 massa cardíaca induzida por aumento de estresse oxidativo, poucos trabalhos se
26 mostram eficientes até o momento. A creatina é um composto capaz de atuar tanto
27 no metabolismo energético, quanto na redução do estresse oxidativo. Sendo assim,
28 a suplementação possui potencial terapêutico para interferência positiva em dois
29 fundamentais aspectos da fadiga do paciente portador de câncer: a falência cardíaca
30 e a anemia.

31

32

33

34

1 3 OBJETIVO

2 Investigar o efeito da suplementação de creatina nas adaptações
3 oxidativas, funcionais da musculares cardíacas e no tecido hematológico em ratos
4 Wistar machos portadores da forma sólida do tumor de Walker-256 em dois tempos
5 experimentais.

6

7 3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

8 - Quantificar creatina total, creatinofosfato e creatina livre no músculo
9 cardíaco;

10 - Caracterizar os níveis de estresse oxidativo através da avaliação das
11 lesões oxidativas e danos em proteínas musculares cardíacas;

12 - Avaliar o perfil proteolítico no músculo cardíaco por atividades
13 semelhantes da calpaina e do proteassoma;

14 - Monitorar perfil elétrico do coração *in vivo* pelo exame de
15 eletrocardiografia;

16 - Mensurar concentração de sais de cálcio em ventrículos cardíacos
17 por coloração de Von Kossa;

18 - Investigar o perfil hematológico dos animais, através da diferenciação
19 de componentes do sangue.

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

1 4 METODOLOGIA

2 4.1 ANIMAIS

3 Foram utilizados ratos Wistar, machos albinos pesando entre 200-250g,
4 provenientes do Biotério Central e mantidos no Biotério do Departamento de
5 Ciências Patológicas da Universidade Estadual de Londrina durante a fase de
6 experimentos. Os animais foram acomodados em gaiolas coletivas contendo no
7 máximo 4 animais por caixa, com ração (Nuvilab CR-1[®], Nuvital[®], Curitiba, Paraná,
8 Brasil) e água mineral filtrada *ad libitum*. Todos os procedimentos foram realizados
9 após aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais, da Universidade
10 Estadual de Londrina sob o número 25894.2014.58, seguindo todas as
11 recomendações do Código Brasileiro para Utilização de Animais de Laboratório
12 (Deliberação CONCEA nº 12 de 20 de Setembro de 2013).

13

14 4.2 MANUTENÇÃO DO TUMOR DE WALKER 256

15 O tumor de Walker 256 é usualmente mantido em laboratório, através de
16 passagens semanais de células viáveis em cavidade abdominal de ratos Wistar,
17 adultos e machos. 6mL de tampão PBS contendo 280UI de heparina foram injetados
18 na cavidade abdominal. Após abertura, o líquido ascítico foi retirado e levado para
19 centrifugação, para precipitação das células tumorais, seguido por 3 lavagens em
20 PBS e encaminhado para determinação de células viáveis pelo método de exclusão
21 pelo azul de Tripán 0,05% em câmara de Neubauer. Após a contagem, as células
22 foram ajustadas para 8×10^7 e, inoculadas i.m. no flanco direito dos animais dos
23 grupos experimentais. No presente trabalho, os animais do grupo controle foram
24 inoculados com 300 μ L de tampão PBS por via intramuscular.

25

26 4.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

27 Foram utilizados 144 animais no total, pesando entre 200 e 250g, que
28 foram inicialmente distribuídos aleatoriamente em 3 grupos experimentais:

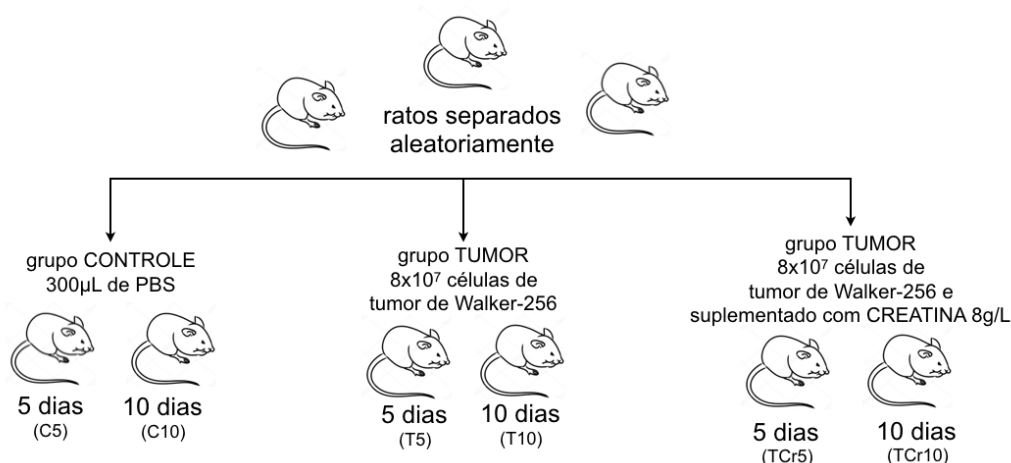
29 1) Grupo controle (C): inoculação i.m. de 0,3mL de tampão PBS no
30 flanco direito;

31 2) Grupo tumor (T): inoculação i.m. de 8×10^7 de células viáveis no
32 flanco direito em 0,3 mL de PBS;

33 3) Grupo tumor suplementado com creatina (TCr): inoculação i.m. de
34 8×10^7 de células viáveis no flanco direito seguido de suplementação com

1 creatina, diluída na água de beber. A creatina foi diluída em água mineral na
 2 concentração de 8g/L (DEMINICE *et al.*, 2016) e ofertada aos animais. A
 3 solução era regularmente trocada a cada 2 dias.

4 Após este primeiro procedimento, cada grupo foi separado em 2 grupos
 5 adicionais: animais acompanhados por 5 dias (C5, T5 e TCr5), e animais
 6 acompanhados por 10 dias (C10, T10 e TCr10). A descrição dos grupos
 7 experimentais encontra-se apresentada na Figura 12.



8

9 **Figura 12. Delineamento experimental.** Os animais foram separados aleatoriamente e divididos em
 10 grupos controle (C), inoculados com células do tumor de Walker-256 (T), e inoculados com células de
 11 tumor de Walker-256 e suplementados com creatina a 8g/L (TCr). Após a separação e inoculação das
 12 células tumorais, os grupos foram subdivididos para serem acompanhados por 5 ou 10 dias.

13

14 4.4 EUTANÁSIA E COLETA DE AMOSTRAS

15 No momento da eutanásia, os animais foram submetidos à anestesia com
 16 cetamina/xilazina (100/160mg/kg), sofreram abertura da cavidade abdominal para
 17 retirada de 3mL de sangue através da veia porta, seguido da ruptura do músculo
 18 diafragma. O coração foi imediatamente colhido e dividido em átrios e ventrículos
 19 através da separação do sulco coronário. As quatro câmaras (átrios e ventrículos
 20 direito e esquerdo) foram separadas do septo cardíaco e utilizando somente a
 21 parede externa, foram então, alíquotadas e imediatamente estocadas em nitrogênio
 22 líquido ou fixadas para análise histológica. Os músculos gastrocnêmios esquerdo de
 23 todos os grupos foram retirados e pesados para a realização do cálculo de perda de
 24 massa muscular. O tumor dos grupos de animais experimentais, T e TCr (5 e 10
 25 dias) foram dissecados cuidadosamente para pesagem e realização do cálculo do
 26 índice de porcentagem de perda de massa corpórea.

1 4.5 ANÁLISES DO TECIDO SANGUÍNEO

2 4.5.1 Hematócrito e Contagem Diferencial de Elementos do Sangue

3 O sangue coletado (1mL) foi acondicionado em tubos contendo EDTA, e
4 imediatamente separado para confecção de lâminas de esfregaço, objetivando a
5 contagem diferencial de leucócitos, de outros elementos do sangue e análise de
6 hematócrito. Para realização do esfregaço sanguíneo, as células foram submetidas
7 à coloração de Leishman. Para a quantificação de leucócitos, utilizou-se a coloração
8 de Giemsa e, para reticulócitos azul de cresil brilhante. Plaquetas e os leucócitos
9 foram contados através de método de contagem em câmara de Neubauer (MALVEZI
10 *et al.*, 2004).

11

12 4.5.2 Glicemia

13 Para a análise da quantidade de glicose presente no sangue, 1mL de
14 sangue total foram colhidos em solução de fluoreto de cálcio 10%. A reação para
15 quantificação se baseou no método enzimático, onde a solução tampão de fosfatos
16 contém p-hidroxibenzoato, 4-aminoantipirina (4-AAP), glicose oxidase e peroxidase.
17 A reação ocorre pela oxidação da 4-AAP resultando em uma coloração
18 avermelhada, proporcional a concentração de glicose na solução e, mensurada por
19 espectrofotômetro a 510nm. Essa reação foi realizada através de kit comercial
20 (Glicose Enzimática Líquida[®], Doles Reagentes e Equipamentos para Laboratório
21 LDTA), seguindo protocolo proposto pelo fabricante.

22

23 4.5.3 Quantificação dos Níveis de Malondialdeído Plasmático

24 O malondialdeído (MDA) é um produto resultante da oxidação lipídica que
25 reage com o ácido tiobarbitúrico para formar um complexo rosa, sendo possível sua
26 detecção por cromatografia líquida de alta performance (HPLC). Brevemente, foram
27 utilizados 160µL de plasma, incubados com 100µL de ácido perclórico 0,5M e 100µL
28 de ácido tiobarbitúrico a 100°C durante 30min. A reação foi resfriada em banho de
29 gelo e adicionado 100µL de tampão fosfato monossódico 1M pH 7, logo, as
30 amostras foram centrifugadas a 5000 x g a 4°C por 10min e filtradas para injetar no
31 HPLC (HPLC-20AT Shimadzu). A fase móvel consistiu em 65% de tampão KH₂PO₄
32 50mM e 35% de metanol para HPLC. As leituras foram realizadas a 535nm durante
33 11 min e fluxo de 0,8mL/min. Os resultados foram expressos em nM de MDA
34 (VICTORINO *et al.*, 2013, adaptado por MARINELLO, *et al.*, 2016).

1 4.5.4 Quantificação de Produtos Avançados da Oxidação de Proteínas no Plasma

2 Conforme descrito por WITKO-SARSAT *et al.* (1996), e HANASAND
3 (2012), as aminas são oxidadas pelo ácido hipocloroso (HOCl) presente no meio e
4 que se converte em compostos orgânicos (cloraminas), que reagem o iodeto de
5 potássio produzindo tri-iodeto que pode ser detectado por espectrometria. Para esse
6 ensaio, o plasma foi diluído em tampão PBS na proporção 1:50 (v/v), e adicionando
7 40µL de amostra diluída no poço de microplaca e incubados em agitação por 2min
8 com 160µL de ácido cítrico 0,2M e 10µL de iodeto de potássio 1,16M. Após a
9 agitação as amostras foram lidas a 340nm e o resultados expressos em µmol/L de
10 cloramina T.

11 4.5.5 Quantificação de Fator de Necrose Tumoral Alfa no Plasma

12 Para esta análise foi utilizado o kit Human TNF-α ELISA Ready-SET-Go®
13 da eBioscience e os procedimentos foram realizados conforme descrito pelo kit.
14

15 4.6 ANÁLISES DO TECIDO CARDÍACO

16 4.6.1 Registro Eletrocardiográfico

17 Para avaliação da função cardíaca dada pelo resultado do
18 eletrocardiograma, um dia antes da implantação do tumor e do início do tratamento
19 com creatina, o registro da atividade foi feito por meio de um eletrocardiógrafo, em
20 todos os animais envolvidos no estudo. Para tanto, os animais foram anestesiados
21 com cetamina/xilazina (8/50mg/kg) (TONETO *et al.*, 2016). Após a aplicação da
22 anestesia, os animais foram acomodados em uma superfície de poliestireno
23 emborrachado para evitar contato com qualquer fonte de condução elétrica. A
24 seguir, foi realizada tricotomia no tórax para aplicação do eletrodo, utilizando gel de
25 carpobol livre de eletrolítico, aplicado nas regiões inguinal e subaxilar. Em seguida,
26 foram plugadas pinças modelo jacaré. Um eletrodo foi aplicado ao tórax, para que a
27 última pinça fosse conectada, fechando o circuito. Utilizou-se um eletrocardiógrafo
28 veterinário (DL650®, DeltaLife com 6 derivações). Depois da estabilização de sinais,
29 registrou-se as ondas por 180 segundos.
30

31 4.6.2 Incorporação de Creatina no Tecido Cardíaco

32 Para verificar se o tratamento com creatina *ad libitum*, via oral, atingia o
33 tecido cardíaco, a quantificação de creatina no mesmo foi determinada pela reação
34

1 de *Jaffe* usando os métodos adaptados de TAUSSKY (1954) e DE SAEDELEER &
2 MARECHAL (1984). Brevemente, 100 mg de tecido cardíaco foram homogeneizados
3 em 1mL de tampão fosfato monobásico 10 mM pH 7,4 NaCl 0,9%. As amostras
4 foram aquecidas para conversão de creatina em creatinina, que reage com ácido
5 pícrico em meio alcalino, formando um complexo avermelhado medido por
6 espectrofotometria. Para determinação de creatina livre, 600µL de ácido pícrico
7 44,4mM foram adicionados a 200µL da amostra. De cada amostra, foram retirados
8 300µL e adicionados a dois tubos contendo 300µL de água destilada (A1 e B1
9 respectivamente). O tubo A1 foi levado ao banho-maria a 100°C durante 1 h e 30
10 min, em um recipiente selado, 1mL de solução tampão contendo, 208 mM de
11 hidróxido de sódio, 12,7mM de tetraborato de sódio e um agente tensoativo foi
12 adicionado a todas as amostras (A1 e A2). As leituras foram realizadas em um
13 espectrofotômetro a 510nm, após incubação de 10min a 37°C. As absorvâncias
14 foram definidas como A1 e A2. Após a adição de 100µL de ácido acético 11,4mM, e
15 incubação à temperatura ambiente durante 5min, novas leituras foram realizadas e
16 as absorvâncias definidas como B1 e B2. A concentração de creatina foi calculada
17 pela fórmula $(A1 - B1) - (A2 - B2)$, utilizando uma curva padrão de 5 a 1000µM de
18 creatina, realizada em triplicata. A creatina cardíaca total foi determinada por
19 hidrólise da fosfocreatina. Para este procedimento, 300µL de homogenato cardíaco
20 foi aquecido em 65°C durante 10min juntamente com 0,4mM de HCl, reação seguida
21 de neutralização por NaOH a 2mM e, pelo procedimento de medição de creatina
22 acima descrito. A creatina total correspondeu à soma de creatina livre e
23 fosfocreatina, determinados pelo kit enzimático da Labtest Diagnóstica S.A.

24

25 4.6.3 Morfometria de Ventrículos

26 Para verificar a hipertrofia ou atrofia cardíacas após a indução do tumor e
27 suplementação com creatina, logo após a coleta, os ventrículos foram fixados em
28 formalina tamponada 10%, a 4°C durante 24 horas. Após o procedimento, os tecidos
29 foram desidratados em etanol graduado (70% -1h30min -, 90% - 1h - e álcool
30 absoluto - 15min -, respectivamente), e na sequência incluídos em blocos de
31 parafina. Foram então realizados cortes semi-seriados (5 µm), cortados em
32 micrótomo (Rotary Microtome SLEE Mainz CUT 6062), e posicionados em lâminas de
33 vidro (5 cortes/lâminas). As peças foram coradas com hematoxilina e eosina, e os
34 ventrículos fotografados em microscópio ocular (Zeiss Discovery V8 com AxioCam

1 ERC5s) utilizando o software Zen[®] 2011 Zeiss com ampliação de 10x e fotografado
2 1 corte/foto. A espessura das paredes dos ventrículos direito e esquerdo foi
3 determinada com base na média de 5 medições/corte não coincidentes, em 5 cortes,
4 usando o software Image-Pro Plus[®] 4.5 (Media Cybernetics, Rockville, EUA).

6 4.6.4 Quantificação de Cálcio no Tecido Cardíaco

7 Após fixação e inclusão em parafina, como descrito no tópico 4.6.3, as
8 peças foram cortadas semi-seriadas em micrótomo (Leica Biosystems RM2125 RTS)
9 na espessura de 6 μ m e posicionado em 4 cortes/lâminas e coradas através da
10 técnica de Von Kossa (CHAPLIN & GRACE, 1975). A técnica baseia-se na
11 identificação de depósitos de cálcio nos tecidos, através da redução de sais de
12 cálcio pela luz forte (40W ou luz UV) ocorrendo a deposição de prata onde antes se
13 encontrava os sais de cálcio. Após a coloração, as peças foram fotografadas em
14 microscópio (Zeiss Axio Imager A1 com AxioCam MRc 5) com ampliação de 200x e
15 as fotos analisadas através do software Image-Pro Plus[®] 4.5 (Media Cybernetics,
16 Rockville, EUA) por inversão de cores e contrastes, revelando assim, a colaração do
17 depósito de nitrato de prata no tecido. A quantidade de cálcio foi mensurada em %
18 de coloração de cálcio/ μ m. Essa técnica foi realizada no Laboratório de Morfometria
19 e Bioquímica Aplicada da Universidade do Porto, Porto, Portugal.

21 4.6.5 Modulação Proteolítica do Tecido Cardíaco

22 Para avaliar a atividade proteolítica no músculo cardíaco utilizou-se o kit
23 comercial Proteasome-Glo[™] Chymotrypsin-Like Cell-based Assay (Promega;
24 Madison, WI, USA), para mensurar através do ensaio de luminescencia a atividade
25 do proteassoma. Para as amostras, foi preparado homogenato na concentração de
26 25mg/mL em tampão PBS. Foram então, incubadas com substrato de luciferina. A
27 clivagem do substrato resulta em liberação de amino-luciferinas, gerando luz que
28 pode ser capturada por equipamento específico. A luz emitida é considerada
29 proporcional a atividade proteolítica da musculatura cardíaca. Os resultados foram
30 expressos em URL/mg de proteína.

31 A atividade das proteases dependentes de cálcio, foram mensuradas por
32 quimiluminescencia utilizando o kit comercial Calpain-Glo[™] Protease Assay. As
33 amostras foram preparadas em tampão 10mM KH₂PO₄ pH 7,4 em 0,9% NaCL. A luz
34 emitida foi proporcional a atividade proteolitica cálcio-dependente, sendo muito

1 semelhante ao que ocorre com a descrição anterior. Os resultados foram
2 expressados em URL/mg de proteína.

3

4 4.6.6 Determinação de Estresse Oxidativo no Músculo Cardíaco

5 4.6.6.1 Quimiluminescência estimulada por *terc*-butil hidroperóxido

6 A técnica foi realizada como descrito por FLECHA, LLESUY & BOVERIS
7 (1991). O composto *terc*-butil hidroperóxido é um potente formador de radicais
8 peroxil que ataca os lipídeos de membrana gerando lipoperóxidos que podem reagir
9 com outros lipídeos, oxidando-os. Assim, o *terc*-butil inicia uma reação de
10 lipoperoxidação que pode ser detectada através da emissão de fótons ocorrida
11 durante a formação de lipoperóxidos. Para esse teste utilizou-se 10mg/mL do tecido
12 cardíaco homogeneizado em tampão fosfato de potássio monobásico 10mM pH 7,4,
13 em NaCl 0,9%. Em 875µL do homogenato, acrescentou-se 105µL do tampão de
14 homogeneização, seguindo-se de incubação por 5 minutos em banho 37°C, após
15 esse período, adicionou-se 20µL da solução de *terc*-butil hidroperóxido (3mM), cada
16 amostra foi acoplada em luminômetro TD 20/20 Promega® para a construção da
17 curva durante a emissão de luz produzida pela reação de lipoperoxidação, durante
18 30min. Os resultados foram expressos em unidade relativa de luz por miligrama de
19 tecido (URL/mg tecido).

20

21 4.6.6.2 Quantificação de proteínas carboniladas

22 As proteínas carboniladas foram quantificadas como descrito por
23 REZNICK e PARKER (1994), com pequenas modificações. Cerca de 50mg do
24 músculo cardíaco foram colocados em tubos contendo 1mL de tampão de
25 homogeneização [tampão fosfato de potássio monobásico 50mM, em 1mM de ácido
26 etilenodiamino tetra-acético (EDTA), pH 7,4]. As amostras de tecido foram
27 homogenizadas, e centrifugadas a 3000 x g durante 10min a 4°C. Em tubos de vidro
28 distintos, adicionou-se 250µL de cada amostra, permanecendo em banho de gelo
29 (BG) durante todo o tempo. Nos dois primeiros tubos de cada amostra, 1mL de
30 solução de 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNPH) foi adicionado, enquanto em um terceiro
31 tubo, 1mL de 2,5N de ácido clorídrico (HCl) foi adicionado, incubando-os durante 1
32 hora em BG, com agitação em vórtex a cada 15min. A seguir, as amostras foram
33 centrifugadas a 3000 x g durante 10min a 4°C e em seguida lavadas com 1250mL
34 de ácido tricloroacético (TCA) 20% (p/v) e incubadas durante mais 20min em BG.

1 Outra lavagem foi realizada com TCA a 10% e as amostras foram incubadas por
2 mais 20min em BG. Após este período as amostras foram centrifugadas a 3000 x g
3 durante 10min a 4°C. Finalmente, os péletes foram lavados três vezes com 1mL de
4 etanol (1:1, v/v) para remover os contaminantes de lípideos livres e DNPH. Ao final,
5 os precipitados foram dissolvidos em 1mL de cloridrato de guanidina 0,6M. A
6 quantificação das proteínas carboniladas se deu através de duas absorvâncias, 355
7 e 390nm, e comparadas entre as amostras tratadas com DNPH e as tratadas com
8 HCl. Para o cálculo, utilizou a seguinte fórmula: $C = (Abs\ 390 - Abs\ 355) \times 45,45$
9 nmol/mL, onde, C é a concentração de DNPH/mL e 45,45 como o coeficiente de
10 absorção. Os valores finais foram expressos em nM/mg de proteína total.

11

12 4.6.6.3 Quantificação de produtos reativos ao ácido tiobarbitúrico

13 A quantificação de dialdeído malônico, um clássico produto da cadeia de
14 lipoperoxidação, foi realizada conforme descrito por OLIVEIRA & CECCHINI (2000).
15 A peroxidação lipídica do tecido cardíaco de todos os grupos foi determinada pela
16 reação de TBARS. O malondialdeído (MDA) formado durante a peroxidação lipídica
17 reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA), para produzir um produto colorido, o aduto
18 $(TBA)_2$ -MDA. Em solução ácida, este aduto absorve luz em 532 nm, que é facilmente
19 extraído em solventes orgânicos, como n-butanol. Foram quantificados os níveis de
20 MDA e os resultados expressos em nmol/g de tecido.

21

22 4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

23 Para verificar a distribuição dos dados, utilizou-se o teste de Shapiro-Wilk.
24 Os dados paramétricos foram expressos como média \pm desvio padrão (SD) e
25 analisados por one-way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni como pós-teste.
26 Os dados não paramétricos foram expressos por meio de mediana [percentil 25 -
27 75%] e analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido por teste de Dunn como pós
28 teste. O ensaio de quimiluminescência estimulada por *tert*-butil hidroperóxido foi
29 analisado por two-way ANOVA para detecção de diferença estatisticamente
30 significativa entre curvas, seguido pelo pós-teste de Bonferroni para avaliação das
31 diferenças quantitativas entre os pontos das curvas médias. Foi adotado o nível de
32 significância de $p < 0,05$. Os softwares OriginLab Pro[®] 9.0 SR2, GraphPad Prisma[®]
33 7, e Microsoft Excel[®] 365 for Mac[®], foram utilizados para o processamento de dados.

34

1 **5. COMENTÁRIOS ADICIONAIS**

2 Os dados obtidos na presente tese deram origem a 2 artigos científicos,
3 intitulados:

4 -.....**Ar**

5 **tigo 1:** Effects of creatine supplementation on cachexia and
6 hematological parameters in Walker-256 tumor-bearing rats;

7 -.....**Ar**

8 **tigo 2:** Time-dependent, proteolytic and contractile modifications in
9 heart and left and right ventricles in cachexia-bearing rats
10 supplemented with creatine.

11 Ambos encontram-se adicionados como apêndice (Apêndice A – Artigo 1
12 e Apêndice B – Artigo 2), e serão submetidos a periódicos ainda a ser definidos.

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32 **REFERÊNCIAS**

33

34 ADAMSON JW. *The anemia of inflammation/malignancy: mechanisms and management.*
35 **Hematology the Education Program of the American Society of Hematology**, 2008. 159-65.

- 1
2 AGTEN A, MAES K, SMUDER A, POWERS SK. *N-acetylcysteine protects the rat diaphragm*
3 *from the decreased contractility associated with controlled mechanical ventilation.* **Crit Care Med**,
4 2011. 39:777-82.
5
6 ANDRYKOWSKI MA, CURRAN SL, LIGHTNER, R. *Off-treatment fatigue in breast cancer*
7 *survivors: a controlled comparison.* **J Behav Med.** 1998. 21(1):1-8.
8
9 ALLEN RG, TRESINI M. *Oxidative stress and gene regulation.* **Free Radic Biol & Med**, 2000.
10 28(3):463-99.
11
12 ANKER SD, COATS A. *Cardiac cachexia: a syndrome with impaired survival and immune and*
13 *neuroendocrine activation.* **Chest**, 1999. 3:836-47.
14
15 ANKER SD, SHARMA R. *The syndrome of cardiac cachexia.* **Int J Cardiol**, 2002. 85:51-55.
16
17 ARGILES JM, BUSQUETS S, FELIPE A, LOPEZ-SORIANO FJ. *Molecular mechanisms involved*
18 *in muscle wasting in cancer and ageing: cachexia versus sarcopenia.* **The Int Journal of**
19 **Biochem and Cell Biol**, 2005. 37:1084-1104.
20
21 BABBAR N, CASERO RA JR. *Tumor necrosis factor-alpha increases reactive oxygen species by*
22 *inducing spermine oxidase in human lung epithelial cells: a potential mechanism for*
23 *inflammation-induced carcinogenesis.* **Cancer Res**, 2006.1;66(23):11125-30.
24
25 BAI CX, NAMEKATA I, KUROKAWA J, TANAKA H, SHIGENOBU K, FURUKAWA T. *Role of*
26 *nitric oxide in Ca²⁺ sensitivity of the slowly activating delayed rectifier K⁺ current in cardiac*
27 *myocytes.* **Circ Res**, 2005. 7;96(1):64-72.
28
29 BACHMANN A, DRAGA M, GRAWE F, KNUST E. *On the role of the MAGUK proteins encoded*
30 *by Drosophila varicose during embryonic and postembryonic development.* **BMC Dev Biol**, 2009.
31 8:55.
32
33 BALLARO R, COSTELLI P, PENNA F. *Animals models of cancer cachexia.* **Curr Opin Support**
34 **Palliat Care**, 2016. Dec;10(4):281-87.
35
36 BARREIRO E, PUENTE B, BUSQUETS S, LOPES-SORIANO FJ, GEA J, ARGILES JM. *Both*
37 *oxidative and nitrosative stress are associated with muscle wasting in tumor-bearing rats.* **FEBS**
38 **Letters**, 2005. 579:1646-52.
39
40 BELLOUM Y, RANNOU-BEKONO F, FAVIER FB. *Cancer-induced cardiac cachexia: pathogenesis*
41 *and impact of physical activity (review).* **Oncol Rep**, 2017. May;37(5):2543-52.
42
43 BELUZI M, PERES SB, HENRIQUES FS, SERTIE RAL, FRANCO FO, SANDOS KB, KNOBI P,
44 ANDREOTTI S, SHIDA CS, NEVES RX, FARMER SR, SEELAENDER M, LIMA FB, BATISTA JR
45 ML. *Pioglitazone treatment increases survival and prevents body weight loss in tumor-bearing*
46 *animals: possible anti-cachexia effect.* **PLoS One**, 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0122660.
47
48 BOGLIOLO L, BRASILEIRO FILHO G. *Patologia.* 9^a ed. Rio de Janeiro. **Guanabara Koogan**,
49 2013.
50
51 BORGES FH, MARINELLO PC, CECCHINI AL, BLEGNISKI FP, GUARNIER FA, CECCHINI R.
52 *Oxidative and proteolytic profiles of the right and left heart in a model of cancer-induced cardiac*
53 *cachexia.* **Pathophysiology**, 2014. 21:257-65.
54 BOUKENS BJ, RIVAUD MR, RENTSCHLER S, CORONEL R. *Misinterpretation of the mouse*
55 *ECG: 'musing the waves of Mus musculus'.* **J Physiol**, 2014. 1;592(21):4613-26.
56

- 1 BROOKS G, FAHEY TD, BALDWIN KM. *Exercise Physiology: Human bioenergetics and its*
2 *applications*. 4^a ed. Berkeley. **McGraw-Hill Higher Education**, 2014.
3
- 4 CHAPLIN AJ, GRACE SR. *Calcium oxalate and the von Kossa method with reference to the*
5 *influence of citric acid*. **Histochemical Journal**, 1975. 7(1975):451-58.
6
- 7 CHENAIS B, ANDRIOLLO M, GUIRAUD P, BELHOSSINE R, JEANNESSON P. *Oxidative*
8 *stress involvement in chemically induce differentiation of K562 cells*. **Free Radic Biol Med**, 2000.
9 1;28(1):18-27.
10
- 11 CHENG AL, KANG YK, CHEN Z, TSAO CJ, QIN S, et al. *Efficacy and safety of sorafenid in*
12 *patients in the Asia-Pacific region with advanced hepatocellular carcinoma: a phas III*
13 *randomized, double-blind, place-controlled trial*. **Lancet Oncol**, 2009. 10(1):25-34.
14
- 15 CHIARUGI P, CIRRI P. *Redox regulation of preotein tyrosine phosphatases during receptor*
16 *tyrosine kinase signal transduction*. **Trends in Biochem Sciencies**, 2003. 28:509-14.
17
- 18 CLARK JF. *Uses of creatine phosphate and creatine supplementation for the athletic*. **Academic**
19 **Press**, 1996. 217-26.
20
- 21 CLARK JF. *Creatine: a review of this nutritional application in sport*. **Nutrition**, 1998. 14:322-4.
22
- 23 COSTELLI P, de TULLIO R, BACCINO FM, MELLORI E. *Activation of CA(2+)-dependent*
24 *proteolysis in skeletal muscle and heart in cancer cachexia*. **BrJ Cancer**, 2001. 84:946-50.
25
- 26 CUSCHIERI J, MAIER RV. *Mitogen-activated protein kinase (MAPK)*. **Critical Care Medicine**,
27 2005. 33:417-19.
28
- 29 DALLALIO G, MEANS RT JR. *Effects of oxidative stress on human erythroid colony formation:*
30 *modulation by gamma-interferon*. **J Lab Clin Med**, 2003. 141(6):395-400.
31
- 32 de GROOF AJ, et al. *The creatine kinase system is essential for optimal re ll of the*
33 *sarcoplasmic re- ticulum Ca²⁺ store in skeletal muscle*. **J Biol Chem**, 2002. 277(5)275-284.
34
- 35 de SOUZA CO, KURUATI MA, de FATIMA SILVA F, et al. *Effects of celecoxib and ibuprofen on*
36 *metabolic disorders induced by Walker-256 tumor in rats*. **Mol Cell Biochem**, 2014. 399:237-46.
37
- 38 DEMETRI GD, KRIS M, WADE J, DEGOS L, CELLA D. *Quality-of-life benefit in chemotherapy*
39 *patients treated with epoetin alfa is independent of disease response or tumor type: results from a*
40 *prospective community oncology study*. **J Clin Oncol**, 1998. 16:3412-25.
41
- 42 DEMINICE R, CELLA PS, PADILHA CS, BORGES FH, SILVA LECM, CAMPOS-FERRAZ PL,
43 JORDAO AA, ROBINSON JL, BERTOLO RF, CECCHINI R, GUARNIER FA. *Creatine*
44 *supplementation prevents hyperhomocysteinemia, oxidative stress and cancer-induced cachexia*
45 *gression in Walker-256 tumor-bearing rats*. **Amino Acids**, 2016. 48:2015-24.
46
- 47 DE SAEDELEER M, MARECHAL G. *Chemical energy usage during isometric twitches of frog*
48 *satorius muscle intoxicated with an isomer of creatine, beta-guanidinopropionate*. **Pflugers Arch**,
49 1984. 404:185-9.
50
- 51 DICATO M, PLAWNY L, DIEDERICH M. *Anemia in cancer*. **Ann Oncol**, 2010. DOI:
52 10.1093/annonc/mdq284.
53
- 54 DOEHNER W, ANKER SD. *Cardiac cachexia in early literature: a review of research prior to*
55 *Medline*. **Int J Cardiol**, 2002. Sep;85(1):7-14.
56

- 1 EARLE WR. *A study of the Walker rat mammary carcinoma 256 in vivo and in vitro*. **Am J**
2 **Cancer**, 1935. 24:455-612.
3
- 4 ELORZA A, HYDE B, MIKKOLA HK, COLLINS S, SHIRIHAI OS. *UCP2 modulates cell*
5 *proliferation through the MAPK/ERK pathway during erythropoiesis and has no effect on heme*
6 *biosynthesis*. **J Biol Chem**, 2008. 7;283(45):30461-70.
7
- 8 EVANS WJ, MORLEY JE, ARGILES J, BALES C, BARACOS V, GUTTRIDGE D, JATOI A,
9 KALANTAR-ZADEH K, LOCHS H, MANTOVANI G, MARKS D, MITCH WE, MUSCARITOLI M, et
10 al. *Cachexia: a new definition*. **Clin Nutr**, 2008. Dec;27(6):793-9.
11
- 12 FEARON KC, BARBER MD, MOSES AG, AHMEDZAI SH, TAYLOR GS, TISDALE MJ, MURRAY
13 GD. *Double-blind, placebo-controlled, randomized study of eicosapentanoic acid diester in*
14 *patients with cancer cachexia*. **J Clin Oncol**, 2006. Jul;24(21):3401-7.
15
- 16 FEARON K, STRASSER F, ANKER SD, BOSAEUS I, BRUERA E, FAINSINGER RL, JATOI A,
17 LOPRINZI C, MacDONALD N, et al. *Definition and classification of cancer cachexia: an*
18 *international consensus*. **The Lancet Oncology**, 2011. 12:489-95.
19
- 20 FERNANDES H. *Banco de imagens científicas para apresentações*. FCIências, 2017. Disponível
21 em <http://www.fciencias.com/2015/08/18/banco-de-imagens-cientificas-para-apresentacoes/>.
22 Acessado de 20 de jul. 2017.
23
- 24 FLECHA B, LLESUY S, BOVERIS A. *Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: a assay for*
25 *oxidative stress in biopsies of heart, liver and muscle*. **Free Radical Biol and Med**, 1991. 10:93-
26 100.
27
- 28 FREEMAN BA, CRAPO JD. *Biology of disease*. **Laboratory investigation**, 1982. 47:412-23.
29
- 30 FREEMAN LM, ROUBENOFF R. *The nutrition implication of cardiac cachexia*. **Nutr Rev**, 1994.
31 52:340-7.
32
- 33 FRANÇA, MF. *O valor do tratamento nutricional na insuficiência cardíaca*. **Rev SOCERJ**, 1988.
34 3:180-85.
35
- 36 FUKUDA T, SUMI T, NOBEYAMA H, YOSHIDA H, MATSUMOTO Y, YASUI T, HONDA K,
37 ISHIKO O. *Multiple organ failure of tumor-bearing rabbits in cancer cachexia is caused by*
38 *apoptosis of normal organ cells*. **Int J Oncol**, 2009. 34:61-7.
39
- 40 GLASPY J, BUKOWSKI R, STEINBERG D, TAYLOR C, TCHEKMEDYIAN S, VADHAN-RAJ S.
41 *Impact of therapy with opoein alfa on clinical outcomes in patients with nonmyeloid malignancies*
42 *during cancer chemotherapy in community oncology practice*. **J Clin Oncol**, 1997. 15:1218-34.
43
- 44 GONZALEZ-FLECHA, B.; LLESUY, S.; BOVERIS, A. Hydroperoxide initiated
45 chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver and muscle. **Free**
46 **Radical Research Communications**, New York, v. 10, p. 93-100, 1991.
47
- 48 GREENHAFF PL. *The nutritional biochemistry of creatine*. **J Nut Biochemistry**, 1997. 11:610-8.
49
- 50 GREENWALD RA. *Oxygen radicals, inflammation, arthritis: pathophysiological considerations*
51 *and implications for treatment*. **Semin Arthritis Rheum**, 1991. 20:2019-240.
52
- 53 GRUNE T, MERKER K, SANDIG G, DAVIES KJA. *Selective degradation of oxidatively modified*
54 *protein substrates by the proteasome*. **Biochem and Biophys Res Commun**, 2003. 305:709-18.
55 GUARNIER FA, CECCHINI AL, SUZUKAWA AA, MARAGNO ALGC, SIMAO AANC, CECCHINI
56 R. *Time course of skeletal muscle loss and oxidative stress in rats with Walker-256 solid tumor*.
57 **Muscle & Nerve**, 2010. Dec;42(6)950-8.

- 1
2 GUIDI C, et al. *Differential effect of creatine on oxidatively-injured mitochondrial and nuclear*
3 *DNA. **Biochim Biophys Acta**, 2008. 780(1):16-26.*
4
- 5 GRUNE T, DAVIES KJ. *The proteasomal system and HNE-modified proteins. **Molec Aspec of***
6 ***Medicine***, 2003. 24:195-204.
7
- 8 GUYTON AC, HALL JE. *Tratado de fisiologia médica. 13ª ed. **Editora Elsevier**, 2017.*
9 HALLIWELL B, GUTTERIDGE JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine, 3rd ed. **Oxford:***
10 ***Clarendon Press**. 1999*
11
- 12 HALLIWELL B, GUTTERIDGE JMC. *Oxidative stress: adaptation, damage, repair and death.*
13 *Free Radicals in Biology in Medicine: 246-350. **Oxford University Press**, 3a Edition, 2007.*
14
- 15 HANASAND M. *Improved detection of advanced oxidation protein products in plasma. **Clin***
16 ***Chimca Acta***, 2012. 413(9/10):901-6.
17
- 18 HENKE M, LASZIG R, RUBE C, SCHAFFER U, HAASE KD, SCHILCHER B, MOSE S, BEER KT,
19 BURGER U, DOUGHERTY C, FROMMHOLD H. *Erythropoietin to treat head and neck cancer*
20 *patients with anaemia undergoing radiotherapy: randomized double-blind, placebo-controlled trial.*
21 ***Lancet***, 2003. 362:1255-60.
22
- 23 FUKUDA T, SUMI T, NOBEYAMA H, YOSHIDA H, MATSUMOTO Y, YASUI T, HONDA K,
24 ISHIKO O. *Multiple organ failure of tumor-bearing rabbits in cancer cachexia is caused by*
25 *apoptosis of normal organ cells. **Int J Oncol***, 2009. 34:61-7.
26
- 27 GUALANO B, ROSCHEL H, LANCHI JR AH, BRIGHTBILL CE, RAWSON ES. *In sickness and*
28 *in health: the widespread application of creatine supplementation. **Amino Acids**. 2011. In press.*
29
- 30 GLASPY J, BUKOWSKI R, STEINBERG D, TAYLOR C, TCHEKMEDYIAN S, VADHAN-RAJ S.
31 *Impact of therapy with opoein alfa on clinical outcomes in patients with nonmyeloid malignancies*
32 *during cancer chemotherapy in community oncology practice. **J Clin Oncol***, 1997. 15:1218-34.
33
- 34 GORDON A, HULTMAN E, KAIJSER L, KRISTJANSSON S, ROLF CJ, NYQUIST O, SYLVEN C.
35 *Creatine supplementation in chronic heart failure increases skeletal muscle creatine phosphate*
36 *and muscle performance. **Cardiovasc Res** 1994. 30(3):413-418.*
37
- 38 HILLAS G, PERLIKOS F, TSILIGIANNI I, TZANAKIS N. *Managing comorbidities in COPD. **Int J***
39 ***of COPD***, 2015. 10:95-109.
40
- 41 HINCH ECA, SULLIVAN-GUNN MJ, VAUGHAN VC, McGLYNN MA, LEWANDOWSKI PA.
42 *Disruption of pro-oxidant and antioxidant system with elevated expression of the ubiquitin*
43 *proteasome system in the cachectic heart muscle of nude mice. **J Cachexia Sarcopenia***
44 ***Muscle***, 2013. 4:287-93.
45
- 46 HIRA TZACA LF, ULICK Jr KS. *Cardiac surgery. **Nutrition in critical care**, 1994. 1994:685-89.*
47
- 48 JUNQUEIRA LC, CARNEIRO J. *O tecido muscular. In: JUNQUEIRA LC, CARNEIRO J.*
49 ***Histologia Básica**. 10ª ed. Rio de Janeiro. **Guanabara Koogan**, 1997. 184-205.*
50
- 51 KAESE S, FROMMEYER G, VERHEULE S, van LOON G, GEHRMANN J, BREITHARDT G,
52 ECKARDT L. *The ECG in cardiovascular-relevant animal models of electrophysiology.*
53 ***Herzschler Elektrophys***, 2013.
54
- 55 KANDARIAN SC, STEVENSON EJ. *Molecular events in skeletal muscle during disuse atrophy.*
56 ***Exerc Sport Rev***, 2002. Jul:30(3):111-6.
57

- 1 KANDARIAN SC, JACKMAN RW. *Intracellular signaling during skeletal muscle atrophy*. **Muscle**
2 **& Nerve**, 2006. 33:155-65.
3
- 4 KIM A, RIVERA S, SHPRUNG D, LIMBRICK D, GABAYAN V, NEMETH E, GANZ T. *Mouse*
5 *models of anemia of cancer*. **PLoS One**, 2014. E93283.
6
- 7 LANGSTEIN HN, NORTON JA. *Mechanism of cancer cachexia*. **Hemat/Oncology Clin of North**
8 **America**, 1991. 5(1):103-23.
9
- 10 LAWLER JM, BARNES WS, WU G, SONG W, DEMAREE S. *Direct antioxidant properties of*
11 *creatine*. **Biochem Biophys Res Commun**, 2002. 290:47-52.
12
- 13 LI YP, CHEN Y, LI AS, REID MB. *Hydrogen peroxide stimulates ubiquitin-conjugating activity*
14 *and expression of genes for specific E2 and E3 proteins in skeletal muscle myotubes*. **Amer J of**
15 **Physiol, Cell Physiol**, 2003. 285:806-12.
16
- 17 LITTLEWOOD TJ, BAJETTA E, NORTIER JW, VERCAMMEN E, RAPOPORT B. *Effects of*
18 *epoetin alfa on hematologic parameters and quality of life in cancer patients receiving*
19 *nonplatinum chemotherapy: results randomized, double-blind, placebo-controlled trial*. **J Clin**
20 **Oncol**, 2001. 19:2865-74.
21
- 22 LOMBARD EA. *Electrocardiograms of small mammals*. **Am Physiol**, 1952. 171(1):189-93.
23
- 24 LOWRY, O. H.; ROSENBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement
25 with the folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 193, p. 265-
26 275, 1951.
27
- 28 MACCIO A, GRAMIGNANO G, MADEDDU C. *Surprising results of a supportive integrated*
29 *therapy in myelofibrosis*. **Nutrition**, 2015. 31(1):239-43.
30
- 31 MACHTAY M, PAJAK TF, SUNTHARALINGAM M, SHENOUDA G, HERSHOCK D, CMELAK AJ,
32 SCHULSINGER A, FU KK. *Radiotherapy with or without erythropoietin for anemic patients with*
33 *head and neck cancer: a randomized trial of the radiation therapy oncology group (RTOG 99-03)*.
34 **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, 2007. 69:1008-17.
35
- 36 MALVEZI AD, CECCHINI R, de SOUZA F, TADOKORO CE, RIZZO LV, PINGE-FILHO P.
37 *Involvement of nitric oxide (NO) and TNF-alpha in the oxidative stress associated with anemia in*
38 *experimental Trypanosoma cruzi infection*. **FESM Immunol Med Microbiol**, 2004. 1;41(1):69-
39 77.
40
- 41 MAMIDANNA R, NACHIAPPAN S, BOTTLE A, AYLIN P, FAIZ O. *Defining the timing and causes*
42 *of death amongst patients undergoing colorectal resection in England*. **Colorectal Dis**, 2015. DOI
43 10.1111/cod.13224.
44
- 45 MANNE ND, LIMA M, ENOS RT, WEHNER P, CARSON JA, BLOUGH E. *Altered cardiac muscle*
46 *mTOR regulation during the progression of cancer cachexia in the ApcMin/+ mouse*. **Int J Oncol**,
47 2003. Jun:42(6):2134-40.
48
- 49 MANTOVANI A, SOZZANI S, LOCATI M, ALLAVENA P, SICA A. *Macrophage polarization:*
50 *tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes*.
51 **Trends Immunol**, 2002. 23(11):549-55.
52
- 53 MARIN-CORRAL J, FONTES CC, PASCUAL-GUARDIA S, SANCHEZ F, OLIVAN M, ARGILES
54 JM, BUSQUETS S, LOPES-SORIANO FJ, BARREIRO E. *Redox balance and carbonylated*
55 *proteins in limb and heart muscles of cachectic rats*. **Antioxid Redox Signal**, 2010. 12:365-80.
56
- 57 MARINELLO PC, DA SILVA TNX, PANIS C, NEVE AF, MACHADO KL, BORGES FH,

- 1 GUARNIER FA, BERNARDES SS, DE-FREITAS-JUNIOR JCM, MORGADO-DIAZ JA, LUIZ RC,
2 CECCHINI R, CECCHINI AL. *Mechanism of metformin action in MCF-7 and MDA-MB-231 human*
3 *breast cancer cells involves oxidative stress generation, DNA damage and transforming growth*
4 *fator β 1 induction. Tumor Biology*, 2015.
5
- 6 MATSUZAWA A, ICHIJO H. *Stress-responsive protein kinases in redox-regulated apoptosis*
7 *signaling. Antioxidants & Redox Signaling*, 2005. 7(3/4):472–81.
8
- 9 MATTHEWS RT, et al. *Neuroprotective effects of creatine and cyclocreatine in animal*
10 *models of Huntington's disease. J Neurosci*, 1998. 18:156-163.
11
- 12 MATTHEWS RT, et al. *Creatine and cyclocreatine attenuate MPTP neurotoxicity. Exp*
13 *Neurol*, 1999. 157:142-149.
14
- 15 MASUTANI H. *Oxidative stress response and signaling in hematological malignancies and HIV*
16 *infection. Int J Hematol*, 2000. 71(1):25-32.
17
- 18 MILLER, G. L. Protein determination for larger numbers of samples. *Analytical Chemistry*,
19 Washington, v. 31, n. 5, p. 964, May. 1959.
20
- 21 MOCK V, OLSEN M. *Current management of fatigue and anemia in patients with cancer. Semin*
22 *in Oncol Nursing*, 2003. 4(2):36-41.
23
- 24 MOORE-CARRASCO R, BUSQUETS S, ALMENDRO V, PALANKI M, LOPEZ-SORIANO FJ,
25 ARGILES JM. *The AP-1/NF-kappaB double inhibitor SP100030 can revert muscle wasting during*
26 *experimental cancer cachexia. Int J Oncol*, 2007. 30:1239-45.
27
- 28 MORCEAU F, DICATO M, DIDDERICH M. *Pro-inflammatory cytokine-mediated anemia:*
29 *regarding molecular mechanisms of erythropoiesis. Mediators of Inflammation*, 2009.
30
- 31 MOSES AM, CHIANG DY, POLLARD DA, IYER VN, EISEN MG. *MONKEY: identifying*
32 *conserved transcription-factor binding sites in multiple alignments using a binding site-specific*
33 *evolutionary model. Genome Biol*, 2004. 5(12):R98.
34
- 35 MUSCARITOLI M, ANKER SD, ARGILES J, AVERSA Z, BUER JM, BIOLO G, BOIRIE Y,
36 BOSAEUS I, et al. *Consensus definition of sarcopenia, cachexia and pre-cachexia: Join*
37 *document elaborated by Special Interest Groups (SIG) 'cachexia-anorexia in chronic wasting*
38 *diseases' and 'nutrition in geriatrics'. Clin Nutr*, 2010. 29:154-59.
39
- 40 MURPHY K. *The pathogenesis and treatment of cardiac atrophy in cancer cachexia. Am J*
41 *Physio Heart Circ Physiol*, 2015. 310:466-77.
42
- 43 MURPHY N, GAYNOR KU, ROWAN SC, WALSH SM, FABRE A, BOYLAN J, KEANE MP,
44 McLOUGHLIN P. *Altered expression of bone morphogenetic protein accessory in murine and*
45 *human pulmonary fibrosis. Am J Pathol*, 2016. 186(3):600-15.
46
- 47 MUSTAFA I, LEVERVE X. *Metabolic and nutritional disorders in cardiac cachexia. Nutrition*,
48 2001. 17:756-60.
49
- 50 NEUBAUER S, REMKES H, SPINDLER M, HORN M, WIESMANN F, PRESTLE J, WALZEL B,
51 ERTL G, HASENFUSS G, WALLIMANN T. *Downregulation of the Na(?) - creatine cotransporter in*
52 *failing human myocardium and in experimental heart failure. Circulation*, 1999. 100(18):1847–
53 1850.
54
- 55 NORMAN K, PICHARD C, LOCHS H, PIRLICH. *Prognostic impact of disease-related*
56 *malnutrition. Clin Nutr*, 2008. Feb;27(1):5-15.
57

- 1 OLIVEIRA FJA, CECCHINI R. *Oxidative stress of liver in hamsters infected with Leishmania*
2 *chagasi*. **The J of Parasit**, 2000. 86(5):1067-72.
- 3
- 4 PERSKY AM, BRAZEAU GA. *Clinical pharmacology of the dietary supplement creatine*
5 *monohydrate*. **Pharmacol Rev**, 2001. 53(2):161-76
- 6
- 7 POWERS SK, DUARTE J, KAVASIS AN, TALBERT EE. *Reactive oxygen species are signaling*
8 *molecules for skeletal muscle adaptation*. **Experimental Physiology**, 2010. 12:1-9.
- 9
- 10 PURINTRAPIBAN J, WANG MC, FORSBERG NE. *Degradation of sarcomere and cytoskeletal*
11 *proteins in cultured skeletal muscle cells*. **Comparative Biochem and Physiol**, 2003. 136:393-
12 401.
- 13
- 14 RABILLOUD T, HELLER M, RIGOBELLO A, AEBERSOLD R, LUNARDI J. *The mitochondrial*
15 *antioxidant defense system and its response to oxidative stress*. **Proteomics**, 2001. 1(9):1105-
16 10.
- 17
- 18 RICQUIER D, CASTEILLA L, BOUILLAUD F. *Molecular studies of the uncoupling protein*.
19 **FASEB J**. 1991. 5(9):2237-42.
- 20
- 21 REZNICK AZ, PACKER L. *Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl*
22 *assay*. **Methods in Enzymology**, 1994. 233:357-363.
- 23
- 24 SIES H. *Role of reactive oxygen species in biological processes*. **Klin Wochenschr**, 1991.
25 Dec;69(21/23):965-8.
- 26
- 27 SABBATINI P, CELLA D, CHANAN-KHAN A, *et al* and National Comprehensive Cancer Network.
28 *Cancer and treatment-related clinical practice guidelines in oncology*. **NCCN v1**.2003. Available at:
29 http://www.nccn.org.physician_gls/f_guidelines.html (acessado Agosto, 2017).
- 30
- 31 SANDERS KJC, KNEPPERS AEM, van de BOOL C, LANGEN RCJ, SCHOLS AMWJ. *Cachexia*
32 *in chronic obstructive pulmonary disease: new insights and therapeutic perspective*. **J of Cach**
33 **Sarcop and Muscle**, 2016. 7:5-22.
- 34
- 35 SATTLER M, WINKLER T, VERMA S, BYRNE CH, SHRIKHANDE G, SALGIA R, GRIFFIN JD.
36 *Hematopoietic growth factors signal through the formation of reactive oxygen species*. **Blood**,
37 1999. 1;93(9):2928-35.
- 38
- 39 SCHNEIDER CD, OLIVEIRA AR. *Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de*
40 *formação e adaptação ao treinamento físico*. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, 2004.
41 10(4):308-13.
- 42
- 43 SCHWARTZ RN. *Anemia in patients with cancer: Incidence, causes, impact, management*
44 *and use of treatment guidelines and protocols*. **Am J Health-Syst Pharm**, 2007. 64(1):5-13.
- 45
- 46 SHARMA S, NEMETH E, CHEN YH, GOODNOUGH J, HUSTON A, et al. *Involvement of*
47 *hepcidin in the anemia of multiple myeloma*. **Clin Cancer Res**, 2008. 14:3262-67.
- 48
- 49 SILVERTHON DU. *Fisiologia humana: uma abordagem integrada*. 5ª ed. **Artmed**, 2010.
- 50
- 51 SPIRO SG, JAMES LE, RUDD RM, TRASK CW, TOBIAS JS, SNEE M, GILLIGAN D, MURRAY
52 PA, RUIZ DE ELVIRA MC, O'DONNELL KM, GOWER NH, HARPER PG, HACKSHAW AK. *Early*
53 *compared with late radiotherapy in combined modality treatment for limited disease small-cell*
54 *lung cancer: a London Lung Cancer Group multicenter randomized clinical trial and meta-*
55 *analysis*. **J Clin Oncol**, 2006. Aug24(24):3823-30.
- 56
- 57 SPRINGER J, TSCHIRNER A, HAGHIKIA A, von HAEHLING S, LAL H, GRZESIAK A

- 1 KASCHINA E, PALUS S, POTSCHE M, von WEBSKY K, HOCHER B, et al. *Prevention of liver*
2 *cancer cachexia-induced cardiac wasting and heart failure.* **Europ Heart J**, 2014. 35:932-41.
3
- 4 STRATTON RJ, HACKSTON A, LONGMORE D, DIXON R, PRINCE S, STROUD M, KING C,
5 ELIA M. *Malnutrition in hospital outpatients and inpatients: prevalence, concurrent validity and*
6 *ease of use of the 'malnutrition universal screening tool' ('MUST') for adults.* **Br J Nutr**, 2004.
7 Nov;92(5):799-808.
8
- 9 STIMPSON SA, LEONARD MS, CLIFTON LS, POOLE JC, TURNER SM, SHEARER TW,
10 REMLINGER KS, CLARK RV, HELLERSTEIN MK, EVANS WJ. *Longitudinal changes in total*
11 *body creatine pool size and skeletal muscle mass using the D3- creatine dilution method.*
12 **Springer-Verlag**, 2013.
13
- 14 TAUSSKY HH. *A microcolorimetric determination of creatine in urine by the Jaffe reaction.* **J Biol**
15 **Chem**, 1954. 208:853-61.
16
- 17 TARNOPOLSKY MA, MARTIN J. *Creatine monohydrate increases strength in patients with*
18 *neuromuscular disease.* **Neurology**, 1999. 10;52(4):854-7.
19
- 20 TARNOPOLSKY MA. *Creatine as a therapeutic strategy for myopathies.* **Amino Acids**, 2011.
21 40(5):1397-407.
22
- 23 TARNOPOLSKY MA. *Potential benefits of creatine monohydrate supplementation in the elderly.*
24 **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, 2000. 3(6):497-502.
25
- 26 TEWARI R, SHARMA V, KOUL N, GHOSH A, JOSEPH C, HOSSAIN SK U, SEN E. *Ebselen*
27 *abrogates TFNa induced pro-inflammatory response in glioblastoma.* **Mol oncol**, 2009. 3(1):77-
28 83.
29
- 30 THALER MS. *The only EKG book: You'll never need.* **Lippincott Williams & Wilkins**, 2007.
31
- 32 TIAN M, ASP ML, NISHIJIMA Y, BELURY MA. *Evidences for cardiac atrophic remodeling in*
33 *cancer-induced cachexia in mice.* **Int J Oncol**, 2011. 39:1321-26.
34
- 35 TISDALE MJ. *Cachexia in cancer patients.* **Nat Rev Cancer**, 2002. 2:862-71.
36
- 37 TISDALE MJ. *Tumor-host interactions.* **J Cell Biochem**, 2004. 93:871-7.
38
- 39 TISDALE MJ. *Reversing cachexia.* **J Cell Biochem**, 2010. 10.1016
40
- 41 TONETO AT, RAMOS LAF, SALOMAO EM, TOMASIN R, AEREAS MA, GOMES-MARCONDES
42 MCC. *Nutrition leucine supplementation attenuates cardiac failure in tumor-bearing cachectic*
43 *animals.* **J of Cachexia, Sarcop and Muscle**, 2016. 7:577-86.
44
- 45 TORRES M, FORMAN HJ. *Redox signaling and the MAP kinase pathways.* **BioFactors**, 2003.
46 17:287-96.
47
- 48 VERGNANI L, HATRIK S, RICCI F, PASSARO A, MANZOLI N, ZULIANI G, et al. *Effect of*
49 *native and oxidized low-density lipoprotein on endothelial nitric oxide and superoxide*
50 *production: key role of L-arginine availability.* **Circulation**, 2000. 101(11):1261-6.
51
- 52 VICTORINO VJ, PANIS C, CAMPOS FC, CAYRES RC, COLADO-SIMÃO AN, OLIVEIRA SR, et
53 *al. Decreased oxidant profile and increased antiox- idant capacity in naturally postmenopausal*
54 *women.* **AGE**. 2013. 35:1411–21.
55
- 56 VOGELZANG NJ, BREITBART W, CELLA D, et al. *Patient, caregiver and oncologist perceptions*
57 *of cancer-related fatigue: results of a tripart assessment survey.* **Semin Hematol**, 1997. 34:4-

- 1 12.
2
3 WAITZBERG D, CORREIA MITD, SEEALAENDER M, LAVIANO A, BUSQUETS S, de MELO
4 AGC, SANTOS FS. *Consenso Brasileiro de caquexia e anorexia em cuidados paliativos*.
5 **Associação Brasileira de Cuidados Paliativos**, 2011.
6
7 WALSMITH J, ROUBENOFF R. *Cachexia in rheumatoid arthritis*. **Int Journal of Cardiology**,
8 2002. 85(1):89-99.
9
10 WELCH JJ, WATTS JA, VAKOC CR, YAO Y, WANG H, HARDISON RC, BLOBEL GA,
11 CHODOSH LA, WEISS MJ. *Global regulation of erythroid gene expression by transcription factor*
12 *GATA-1*. **Blood**, 2004. 104:3136-47.
13
14 WITKO-SARSAT V, FRIEDLANDER M, CAPELLERE-BLANDIN C, NGUYEN-KHOA T,
15 NGUYEN AT, ZINGRAFF J, JUNGERS P, DESCAMPS-LATSCHA B. *Advanced oxidation protein*
16 *products as a novel marker of oxidative stress in uremia*. **Kidney**, 1996. 49:1304-13.
17
18 WITTE KK, CLARK AL, CLELAND JG. *Chronic heart failure and micronutrients*. **J Am Coll**
19 **Cardiol**, 2001. 37:1765-774.
20
21 WYSS M, KADDURAH-DAOUK R. *Creatine and creatinine metabolism*. **Physiological Reviews**,
22 2000. 80:1107-213.
23
24 WYSS M, SCHULZE A. *Health implications of creatine: can oral creatine supplementation protect*
25 *against neurological and atherosclerotic disease?* **Neuroscience**, 2002. 112(2):243-60.
26
27 ZOU X, WANG JL, LU J, SONG Y, KWARK KS, JIAO Q, ROSENFELD R, CHEN Q, BOONE T,
28 SIMONET WS, LACEY DL, GOLDBERG AL, HAN HQ. *Reversal of cancer cachexia and muscle*
29 *wasting by ActRIIB antagonismo leads to prolonged survival*. **Cell**, 2010. Aug;142(531-43).
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27

APÊNDICES

APÊNDICE A

Effects of creatine supplementation in cachexia and hematological parameters in tumor-bearing Walker 256 rats

1 Fernando Henrique Borges¹, Polina Camila Marinello², Aparecida Donizette Malvezi³,
2 Phílano Pinge-Filho³, Rafael Deminice⁴, Alessandra Lourenço Cecchini Armani²,
3 Flavia Alessandra Guarnier⁵, Rubens Cecchini*¹.
4

5 ¹Laboratory of Pathophysiology and Free Radicals, Department of General
6 Pathology, 86051- 990, Londrina, Brazil.

7 ²Laboratory of Molecular Pathology, Department of General Pathology, 86051-990,
8 Londrina, Brazil.

9 ³Departamento de Patológicas Ciências, 86051-970, Londrina, Brazil.

10 ⁴Department of Physical Education, 86051-990, Londrina, Brazil.

11 ⁵Laboratory of Pathophysiology and Muscle Adaptation, Department of General
12 Pathology, 86051-990, Londrina, Brazil.
13
14

15

16

17

18

19

20 ***Corresponding author:**

21 Rubens Cecchini

22 Laboratory of Pathophysiology and Free Radicals

23 Department of General Pathology

24 Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445, km 380,

25 Campus Universitário

26 e-mail: rubenscecchini@hotmail.com

27 Phone/Fax +55-43-3371-4521

28 86051-990 Londrina, Brazil
29
30
31

32 **Abstract**

33 Systemic alterations are frequently associated with cancer cachexia. Creatine
34 supplementation has emerged as a promising therapy in various complications
35 caused by tumor development, however, the effects of creatine supplementation in
36 cancer-induced systemic alterations was poorly investigated. So, the objective of this
37 study was to investigate the role of creatine supplementation in cancer cachexia and
38 in some cachexia-related systemic alterations. The animals were divided into 6

1 groups: control for 5 and 10 days (C5; C10), tumor-bearing 5 and 10 days (T5; T10 –
2 $8,0 \times 10^7$ cells in 0.3mL PBS, i.m., on the right flank) and tumor-bearing treated with
3 creatine for 5 and 10 days (TCr5; TCr10 – tumor implantation + creatine in drinking
4 water – 8g/L). Animals were weighed and the food ingestion were monitored daily.
5 After the experimental period, blood, gastrocnemius muscle and tumor were
6 collected and weighed. In general, tumor development induced loss of body and
7 gastrocnemius muscle weight, anorexia, anemia, reduced glicemia, reticulocytosis,
8 leukocytosis and increased platelets. Regarding oxidative stress and inflammation,
9 tumor increased plasmatic oxidative stress (malondialdehyde and advanced oxidized
10 protein products) and TNF- α . According to the severity, tumor development induced
11 precachexia in the model of five days and cachexia in the model of ten days.
12 Creatine supplementation prevented all the parameters of precachexia. However, in
13 the model of ten days, the supplementation was only able to prevent some
14 parameters of cachexia, as the loss of body weight and anorexia. Supplementation
15 also prevented systemic oxidative stress, anemia and reticulocytosis. The analysis of
16 the results allows us to conclude that creatine supplementation presented protective
17 effects in precachexia and cachexia in tumor-bearing animals, reverting or improving
18 important systemic parameters related to the debilitating condition of the syndrome.
19

20

21 **Introduction**

22 Tumor progression is accompanied with several alterations in the organism
23 such as anorexia [1], loss of muscle mass [2], cardiac abnormalities [3], increased
24 oxidative stress [2,3] and inflammation [4], besides alterations in hematological
25 parameters [5]. One of the most debilitating conditions induced by some types of
26 cancer is cachexia, which is a syndrome often neglected due the difficulty of
27 diagnosis, being possible only in advanced stages [1]. Cachexia was defined
28 historically as a multifactorial syndrome with an ongoing loss of skeletal muscle mass
29 (with or without loss of fat mass) that cannot be fully reversed by conventional
30 nutritional support and leads to progressive functional impairment. According to
31 degree of depletion of energy stores and body protein in combination with degree of
32 ongoing weight loss, this syndrome can develop progressively through various
33 stages—precachexia, cachexia and refractory cachexia [6].

34 Systemic alterations, as anorexia, inflammation, oxidative stress, insulin
35 resistance and increased muscle protein breakdown are frequently associated with
36 cachexia [6]. Anemia is another complication observed in patients with cancer
37 associated with increased oxidative stress or bone marrow suppression induced by
38 pro-inflammatory mediators, such as TNF- α and chemotherapy treatment, being
39 mainly related to poor prognosis, decreased quality of life and reduced survival [5].

40 Considering the deleterious effects that systemic cancer-related complications

1 induces in the patients, the search for substances that can reduce these
2 complications could contribute to improve patients' quality of life. In this context,
3 creatine supplementation has emerged as a promising therapy in various
4 complications caused by tumor development, as cardiac abnormalities, reduced
5 glycogen reserves, insulin resistance, among others [7; 8; 9] This compound
6 presents some beneficial effects, as ability to increase energetic potential of cells,
7 preserving muscle glycogen, antioxidant effects, decrease muscle levels of calcium
8 and reduction of apoptosis [10; 11]. Furthermore, Tisdale *et al.* [12] and STIMPSON
9 *et al.* [13] demonstrated that creatine supplementation could reverse the cancer-
10 associated loss of mass in skeletal muscle. However, despite the promising observed
11 results, the effects of creatine supplementation in systemic alterations induced by
12 cancer was not investigated yet. So, the objective of this study was to investigate the
13 role of creatine supplementation in cancer cachexia and in some cachexia-related
14 systemic alterations.

15 **Methods**

16 *Animals and experimental design*

17 Adult male Wistar rats weighing 200-250g were obtained from the animal house
18 of the biological sciences center from State University of Londrina, Brazil. All
19 procedures were conducted in complete conformance with the Guide for the Care
20 and Use of Laboratory Animals [DHEW Publication No. (NIH) 86-23, revised 1985;
21 Office of Science a Health Reports, DRR/NIH, Bethesda, MD, and were also
22 approved by the institutional ethics comitte for animal research (nº 204/2014).
23 Animals received commercial food (CR Nuvilab® Nuvital®) *ad libitum* and housed in
24 collective cages on a 12h light/dark cycle at a mean temperature of 22°C. After three
25 days of acclimatization, rats were randomly divided into five groups designated as:
26 control (C, $n=8$), tumor-bearing followed for 5 days after implantation (T5, $n=8$);
27 tumor-bearing followed by 10 days after implantation (T10, $n=8$); tumor-bearing
28 followed for 5 days after implantation supplementation with creatine (TCr5, $n=8$); and
29 tumor-bearing followed for 10 days after tumor implantation supplementation with
30 creatine (TCr10, $n=8$). The creatine used as supplement (Creatine Powder,
31 Universal Nutrition®, 93% purity) was diluted in filtered mineral water (8 g/L) and
32 supplied to treated groups during the experimental times (5 and 10 days) in the
33 drinking water. The food intake was monitored daily and it was performed an average

1 to estimate the consumption of each animal per cage. The water consumption was
2 performed every 2 days, once, when solution was replaced, to avoid contamination.

3

4 *Tumor Implantation and wasting parameters*

5 Tumor cells were maintained in our laboratory as an ascitic intraperitoneal
6 tumor (2×10^6 cells/0.5mL PBS). At the moment of inoculation, tumor cells were
7 removed from the peritoneal cavity (with $8 \mu\text{L}/\text{mL}$ of 5000 IU/mL heparin) and
8 centrifuged at $1000 \times g$, when the intermediate phase was collected. The percentage
9 of viable cells was determined by trypan blue dye exclusion (nonviable cells stained
10 blue), using a Neubauer chamber. Control group received $300 \mu\text{L}$ of phosphate-
11 buffered saline (PBS – vehicle for cells) injected intramuscularly into the right upper
12 hindlimb. The tumor-bearing groups received a Walker-256 tumor cells suspension
13 (8×10^7 cells in $300 \mu\text{L}$ of PBS) injected intramuscularly into the right upper hindlimb.
14 On days 5 and 10 after the implantation or PBS administration, all the animals were
15 anesthetized with ketamine/xylazine mixture ($100 \text{mg}/\text{kg}$ and $160 \text{mg}/\text{kg}$ intramuscular
16 injection respectively), suffered abdomen opening to collect the blood in portal vein,
17 and then they were euthanized by decapitation under the anesthesia. Gastrocnemius
18 muscle was collected and weighed. In addition, tumors were also carefully excised
19 and weighed. The variation of body weight were also calculated (final body weight –
20 initial body weight). Body mass loss index and the estimation of total body weight
21 loss were calculated and considered in order to determine a pattern of general
22 wasting. It was determined considering the body weight gain of control rats and the
23 tumor mass in tumor-bearing rats.

24

25 *Blood cells quantification*

26 Blood was collected in tubes containing EDTA and separated to making smear
27 slides for counting and differentiation of leukocytes and other elements of blood, such
28 as, platelets and reticulocytes, stained by Leishman, and hematocrit preparation. For
29 leukocytes count Giemsa staining was used and for reticulocytes Brilliant cresyl blue.
30 Platelets and leukocytes were counted through Neubauer's chamber.

31 *Glucose quantification*

32 After blood collection, one part was added to tubes containing 10% calcium
33 fluoride, and the tubes left rest diagonally, avoiding the glucose degradation.
34 Collected serum was then diluted 1:50 in PBS buffer. For analysis, the Liquid

1 Enzyme Glucose Kit[®] of Doles Reagents and Equipment for the LDITA Laboratory
2 was used, following the protocol proposed by the kit.

3

4 *Advanced oxidation proteins products (AOPP)*

5 To evaluate the presence of oxidized protein formation from a possible
6 inflammatory response, AOPP levels were measured as described by Witko-Sarsat
7 *et al.* [14] and Hanasand *et al.* [15] with some adaptations. Part of blood was
8 collected and added into tubes containing EDTA for plasma extraction. Plasma was
9 then diluted 1:50 in PBS buffer. Samples or chloramine-T standard solutions (40 μ L)
10 were placed in the appropriate wells of a 96-well microplate, 10 μ L of 1.16M KI and
11 160 μ L of citric acid 0.2M were added to each well. The absorbance of the reaction
12 mixture was immediately read in a microplate reader (Multiskan GO, Thermo
13 Scientific[™], Waltham, USA) at 340nm against a blank well containing 190 μ L of PBS
14 and 10 μ L of KI, followed in another well 190 μ L of citric acid and 10 μ L of KI. AOPP
15 levels were calculated using a chloramine-T calibration curve (Sigma-Aldrich[™]) and
16 results expressed in μ mol/L chloramine T.

17

18 *Lipoperoxidation*

19 The malondialdehyde (MDA) resulting from lipid oxidation reacts with
20 thiobarbituric acid to form a pink complex with was determined by high-performance
21 liquid chromatography. The 160 μ L volume of plasma were incubated with 100 μ L
22 perchloric acid 0.5M and then with 100 μ L thiobarbituric acid at 100°C for 30 min. The
23 reaction was cooled in an ice bath and centrifuged at 5000 \times g at 4°C. The readings
24 are taken at 535 nm during 11 min, and the results were expressed in nM MDA [16].

25

26 *TNF- α quantification*

27 For this analysis was used eBioscience Ready-SET-Go[®] ELISA TNF-Human
28 Kit and the procedures followed the manufacturer's recommendations.

29

30

31 *Statistical analysis*

32 Shapiro-Wilk was applied to test normality and ROUT for outliers. Normal
33 distribution data were then expressed as mean \pm standard deviation (SD) and One-
34 way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni *post-hoc test* were applied

1 to check statistically significant differences. No parametric distribution data were
2 expressed as median [25 - 75% percentile], and then Kruskal-Wallis test followed by
3 Dunn's *post-hoc test* used to check differences. $p < 0.05$ was considered statistically
4 significant. GraphPad Prism[®] 7, Numbers[®] 3.6 and Microsoft Excel[®] 365 softwares
5 were used for data processing.

6

7 **Results**

8 *Characterization of cachexia*

9 Among the several modifications that occurred during tumor development
10 (tumor weight: T5: 3.8 ± 0.48 g and T10: 11.73 ± 2.17 g), the most evident are the loss of
11 body mass, decreased food intake and loss of muscle mass. As demonstrated in
12 Table 1, there was a intense reduction in weight gain of animals inoculated with
13 tumor (T5: -9.16 ± 1.47 g and T10: -31.17 ± 4.21 g), and a reduction in the percentage of
14 weight variation (T5: -3.45 ± 0.47 % and T10: -10.69 ± 1.31 %), decrease in food intake
15 (T5: 13.88 ± 1.51 g and T10: 12.29 ± 0.81 g) and loss of gastrocnemius mass (T5:
16 932 ± 115 mg and T10: 841 ± 66 mg) when compared to control group (C). Creatine
17 supplementation was able to prevent many alterations occurred as body mass (TCr5:
18 14.01 ± 4.23 and TCr10: 15.05 ± 2.97 g) and weight variation (TCr5: 5.47 ± 1.62 % and
19 TCr10: 6.01 ± 1.71 %), food intake (TCr5: 17.24 ± 0.41 g and TCr10: 16.18 ± 0.52 g) and
20 gastrocnemius mass (TCr5: 1137 ± 50 mg and TCr10: 1089 ± 74 mg). In relation to
21 tumor mass, the supplementation decreased this parameter only in the TCr10 group
22 (28.64%).

23

24

--- Table 1---

25

26 *Red blood cells and platelets parameters*

27 Table 2 shows the variation in red blood cells and platelets in tumor-bearing
28 rats at 5th and 10th day after tumor implantation, and tumor-bearing rats
29 supplemented with creatine. Hematocrit showed a decrease in red blood cells in
30 both T5 (36.5% [36 - 38]) and T10 (32.5% [21 - 34]) and increase in number of
31 reticulocytes in T5 (36.5% [36 - 38]) and T10 (32.5% [21 - 34]) when compared to
32 control. Consequently, platelets had a high number of cells in T5 (9000 [8700 -
33 9225]) and no differences were observed in T10 when compared to group C. On the

1 other hand, the creatine supplementation was able to prevent such changes from
2 occurring.

3

4

--- Table 2 ---

5

6 *White blood cells parameters*

7 In Table 3 we can observe the quantification of white blood cells. In total
8 leukocytes, we observed an increase in both groups T5 ($180.5 \times 10^2/\text{mm}^3$ [140.0 -
9 184.75]) and T10 ($142.0 \times 10^2/\text{mm}^3$ [137.0 - 195.5]), consequently observable in other
10 cells, such as neutrophils (T5: $95.49 \times 10^2/\text{mm}^3$ [91.6 - 99.55] - T10: $47.84 \times 10^2/\text{mm}^3$
11 [41.1 - 63.45]) and monocytes (T5: $17.9 \times 10^2/\text{mm}^3$ [14.88 - 19.91] - T10:
12 $15.3 \times 10^2/\text{mm}^3$ [12.69 - 17.16]), lymphocytes already showed an increase in cell
13 number only in T10 ($72.33 \times 10^2/\text{mm}^3$ [64.85 - 78.19]) when compared to control. In
14 contrast, creatine supplemented groups showed increased leukocytes when
15 compared to their corresponding groups (TCr5: $248.0 \times 10^2/\text{mm}^3$ [201.0 - 264.0] -
16 TCr10: $263.0 \times 10^2/\text{mm}^3$ [206.0 - 285.75]), showing increased neutrophils (TCr5:
17 $168.58 \times 10^2/\text{mm}^3$ [15.05 - 176.77] - TCr10: $151.29 \times 10^2/\text{mm}^3$ [124.28 - 173.92]),
18 however monocytes increased in TCr10 ($21.3 \times 10^2/\text{mm}^3$ [20.7 - 22.72]) whereas
19 lymphocytes did not show any changes.

20

21

--- Table 3 ---

22

23 *Systemic parameters of oxidative stress and inflammation*

24 The level of glucose decreased during tumor development, in T5
25 ($105.2 \pm 9.51 \text{mg/dL}$) and T10 ($67.07 \pm 11.4551 \text{mg/dL}$) when compared to control group
26 ($0.6 \pm 0.151 \text{mg/dL}$). The levels of AOPP (T5: $3.55 \pm 0.76 \mu\text{mol}$ of chloramine T - T10:
27 $2.92 \pm 0.49 \mu\text{mol}$ of chloramine T), TNF- α (T5: $186.6 \pm 33.91 \text{pg/mL}$; T10:
28 $183.5 \pm 22.35 \text{pg/mL}$) and MDA (T5: $4348 \pm 684.6 \text{nM MDA}$; T10: $5708 \pm 133.4 \text{nM MDA}$)
29 showed high levels in both experimental times in animals with tumor when compared
30 to C group. The supplementation with creatine increased the availability of glucose in
31 T5 ($160.4 \pm 18.5351 \text{mg/dL}$) but not in T10 ($86.92 \pm 7.8451 \text{mg/dL}$) and decreased AOPP
32 in both experimental periods (T5: $1.48 \pm 0.58 \mu\text{mol}$ of chloramine T - T10:
33 $1.95 \pm 0.21 \mu\text{mol}$ of chloramine T) but failed to reduce the levels of TNF- α whereas
34 MDA, decreasing this levels only in the TCr10 group ($4107 \pm 468.3 \text{nM MDA}$).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34

--- Figure 1 ---

Discussion

This work has showed that tumor development induced precachexia in the model of five days and cachexia in the model of ten days, according to the definition proposed by Fearon et al. [6]. The authors defined precachexia as a condition when a loss of body weight \leq than 5%, anorexia and metabolic changes are present. T5 group presented 3.4% of loss of body weight, reduction in food intake, and reduction in gastrocnemius weight, which is considered a parameter of metabolic change, characterizing a pre-cachetic state. On the other hand, cachexia is defined when a loss of body weight $>$ than 5%, anorexia and systemic inflammation are present [6]. T10 group presented 10% of loss of body weight, anorexia and increased TNF- α levels, characterizing a cachetic state. The creatine supplementation demonstrated to be very effective in the model of five days, reverting all the parameters of precachexia. However, in the model of ten days, the supplementation was only able to revert some parameters of cachexia, as the loss of body weight and anorexia. The loss of gastrocnemius weight was only partially reverted (35% of loss in T10 group and 16% of loss in TCr10 group) and TNF- α levels remained high.

During tumor progression it was possible to observe hematological changes, among them, the reduction in the number of red cells, leading to anemia, observed in hematocrit parameter. This decrease may be related to both lipoperoxidation, which can lyse red blood cells, as for the suppression of bone marrow by the increased levels of the TNF- α .

The TNF- α has an important role in regulation of hematopoiesis. It is pointed out as a hematopoiesis inhibitor through downregulation of GATA Binding Protein 1, a β -globin gene activator [17; 18; 19; 20; 21], responsible for maturation of blood cells. According to Malvezi *et al.* [22], decreased red blood cells caused by oxidation of membrane lipids in red cells induces an increase in systemic reticulocytes, because the bone marrow attempts to restore hematopoietic balance and release unripe cells (reticulocytes).

In this work, it was possible to verify increase in both plasmatic MDA and AOPP, which are indicative of systemic oxidative stress, accompanied by hematocrit reduction, increased TNF- α and reticulocytes in animals with tumor in both

1 experimental times. Creatine supplementation has showed protective effect in many
2 of these parameters. Researchers suggest that creatine has direct and indirect
3 antioxidant effects [23; 24], being able to scavenge superoxide and peroxynitrite
4 anions, besides to increase thiol redox system. Creatine antioxidant action was
5 probably related to the prevention in the systemic oxidative stress induced by tumor,
6 reversing anemia and reticulocytosis.

7 Increased platelets levels observed in animals with tumor may be an indicative
8 of poor prognosis, since it has already been described that platelets are able to
9 increase migration of neoplastic cells and promote hematogenous metastasis [25]
10 due to, among other facts, the reduction in immunological recognition. Animals
11 receiving creatine supplementation did not present increase in number of platelets,
12 indicating lower probability of metastasis.

13 Regarding blood glucose, it was observed reduced levels in animals with
14 tumor, which can be explained by increased consumption of this nutrient by
15 proliferating tumor cells. Creatine supplementation was efficient in preventing this
16 parameter in animals with tumor in 5 days, however it was not able to totally prevent
17 the glucose consumption in 10 days, probably by the most advanced stage of
18 disease in these animals, although supplementation reduced the tumor weight.

19 It was observed that animals with tumor present leukocytosis, mainly
20 characterized by an increase in neutrophils and monocytes. It is commonly observed
21 a pro-inflammatory state induced by tumor. Studies indicate systemic inflammation
22 and oxidative stress, with increased NF- κ B and TNF- α , as the main responsible for
23 metabolic alterations present in cancer cachexia [26; 27; 28]. In this study, it was
24 observed that creatine supplementation increased leukocytosis in both experimental
25 times and did not revert the elevation in TNF- α levels in animals with tumor.
26 However, supplementation exerted protective effects in the loss of body and muscle
27 weight, probably due to its antioxidant action. In addition, is important to consider the
28 results obtained in the quantification of AOPP, which reflects inflammatory protein
29 oxidation [15]. Systemic AOPP levels increase in T5 and T10 groups, however were
30 significantly lower in animals receiving creatine supplementation, which indicates
31 that, despite leukocytosis, oxidative and inflammatory damage to plasma proteins
32 was reduced with supplementation.

33 The analysis of the results allows us to conclude that creatine supplementation
34 presented protective effects in precachexia and cachexia in tumor-bearing animals,

1 reverting or improving important systemic parameters related to the debilitating
 2 condition of the syndrome. However, the supplementation was more efficient in the
 3 beginning of the process, in the precachexia state, when all of the parameters could
 4 be prevented.

6 Reference

- 7 [1] Muscaritoli A; Anker SD; Argules J; Aversa Z; Bauer JM; Biolo G; Boirie Y; Bosaeus I;
 8 Cederholm T; Costelli P; Fearon KC; Laviano A; Maggio M; Fanelli FR; Schneider SM;
 9 Achols A; Sieber CC. *Consensus definition of sarcopenia, cachexia and pre-cachexia: join*
 10 *document elaborated by Special Interest Groups (SIG), "cachexia-anorexia in chronic*
 11 *wasting diseases" and "nutrition in geriatrics". **Clinical Nutrition**, 2010; 29:154-9.*
 12
- 13 [2] Guarnier FA, Cecchini AL, Suzukawa AA, Maragno ALGC, Simão AANC, Cecchini R.
 14 *Time course of skeletal muscle loss and oxidative stress in rats with walker 256 solid tumor.*
 15 **Muscle & Nerve**, 2010; 42(6):950-8.
- 16
- 17 [3] Borges FH; Marinello PC; Cecchini AL; Blegniski FP; Guarnier FA; Cecchini R. *Oxidative*
 18 *and proteolytic profiles of the right and left heart in a model of cancer-induced cardiac*
 19 *cachexia. **Pathophysiology**, 2014; 21:257-265.*
 20
- 21 [4] May Y; Ren Y; Dai ZJ; Wu CJ; Ji Yh; Xu J. *IL-6, IL-8 and TNF- α levels correlate with*
 22 *disease stage in breast cancer patients. **Adv Clin Exp Med**, 2017; 26:421-26.*
 23
- 24 [5] Dicato M; Plawny L; Diederich M. *Anemia in cancer. **Annals of Oncology**, 2010; 7:167-*
 25 *72.*
 26
- 27 [6] Fearon K; Strasser F; Anker SD; Bosaeus I; Bruera E; Fainsinger RL; Jatoi A; Loprinzi C;
 28 MacDonald N; Mantovani G; Davis M; Muscaritoli M; Ottery F; Radbruch L; Ravasco P;
 29 Walsh D; Wilcock A; Kaasa S; Baracos VE. *Definition and classification of cancer cachexia:*
 30 *an international consensus. **Lancet Oncology**, 2011; 12:489-95.*
 31
- 32 [7] Gualano B; Roschel H; Lancha-Jr AH; Brightbill CE; Rawson ES. *In sickness and in*
 33 *health: the widespread application of creatine supplementation. **Amino Acids**, 2012; 43:519-*
 34 *29.*
 35
- 36 [8] Gordon A; Hultman E; Kaijser L; Kristjansson S; Rolf CJ; Nyquist O; Sylven C. *Creatine*
 37 *supplementation in chronic heart failure increases skeletal muscle creatine phosphate and*
 38 *muscle performance. **Cardiovasc Res**, 1994; 30(3):413-18.*
 39
- 40 [9] Neubauer S; Remkes H; Spindler M; Horn M; Wiesmann F; Prestle J; Walzel B; Ertl G;
 41 Hasenfuss G; Wallimann T. *Downregulation of the Na(?) - creatine cotransporter in failing*
 42 *human myocardium and in experimental heart failure. **Circulation**, 1999; 100(18):1847-50.*
 43
- 44 [10] Tarnopolsky M; Martin J. *Creatine monohydrate increases strength in patients with*
 45 *neuromuscular disease. **Neurology**, 1999; 10;52(4):854-7.*
 46
- 47 [11] Tarnopolsky MA. *Creatine as a therapeutic strategy for myopathies. **Amino Acids**,*
 48 *2011; 40(5):1397-407.*
 49
- 50 [12] Tisdale MJ. *Reversing cachexia. **J Cell Biochem**, 2010; 142(4):511-12.*
 51
- 52 [13] Stimpson SA; Leonard MS; Clifton LS; Poole JC; Turner SM; Shearer TW; Remlinger
 KS; Clark RV; Hellerstein MK; Evans WJ. *Longitudinal changes in total body creatine pool*

- 1 size and skeletal muscle mass using the D3- creatine dilution method. **J Cachexia**
2 **Sarcopenia Muscle**, 2013; 4(3):217-23.
3
- 4 [14] Witko-Sarsat V; Friedlander M; Capeillere-Blandin C; Nguyen-Khoa T; Nguyen AT;
5 Zingraff J; Jungers P; Descamps-Latscha B. *Advanced oxidation protein products as a novel*
6 *marker of oxidative stress in uremia.* **Kidney**, 1996; 49:1304-13.
7
- 8 [15] Hanasand M. *Improved detection of advanced oxidation protein products in plasma.*
9 **Clinica Chimica Acta**, 2012; 413: 901-906.
10
- 11 [16] Marinello PC; Da Silva TNX; Panis C; Neves AF; Machado KL; Borges FH; Guarnier FA;
12 Bernardes SS; De-Freitas-Junior JCM; Morgado-Díaz JA; Luiz RC; Cecchini R; Cecchini AL.
13 *Mechanism of metformin action in MCF-7 and MDA-MB-231 human breast cancer cells*
14 *involves oxidative stress generation, DNA damage, and transforming growth factor β 1*
15 *induction.* **Tumor Biology**, 2016; 37(4):5337-46.
16
- 17 [17] Bresnick EH, Katsumura KR, Lee HY, Johnson Kd, Perkins AS. *Master regulatory GATA*
18 *transcription factors: mechanistic principles and emerging links to hematologic malignancies.*
19 **Nucleic Acids Res**, 2012; 40:5819-13.
20
- 21 [18] Bresnick EH, Lee HY, Fujiwara T, Johnson KD, Keles S. *GATA switches as*
22 *developmental drivers.* **J Biol Chem**, 2010; 285:31087-93.
23
- 24 [19] Evans T, Reitman M, Felsenfeld G. *An erythrocyte-specific DNA-binding factor*
25 *recognizes a regulatory sequence common to all chicken global genes.* **Proceedings of the**
26 **National Academy of Science of the USA**, 1988; 85:5976-80.
27
- 28 [20] Welch JJ, Watts JA, Vaco CR, Yao Y, Wang H, Hardison RC, Blobel GA, Chodosh LA,
29 Weiss MJ. *Global regulation of erythroid gene express by transcription factor GATA-1.*
30 **Blood**, 2004; 104:3136-47.
31
- 32 [21] Cheg Y, Wu W, Kumar SA, Yu D, Deng W, Tripic T, King DC, Chen KB, Zhang Y, Drautz
33 D, Giardine B, Schuster SC, Mille W, Chiaromonte F, Zhang Y, Blobel GA, Weiss MJ,
34 Hardison RC. *Erythroid GATA1 function revealed by genome-wide analysis of transcription*
35 *factor occupancy, histone modifications and mRNA express.* **Genome Research**, 2009;
36 19:2172-84.
37
- 38 [22] Malvezi AD, Cecchini R, Souza F, Tadoroko CE, Rizzo LV, Pinge-Filho P. *Involvement*
39 *of nitric oxide (NO) and TNF- α in the oxidative stress associated with anemia in experimental*
40 *Trypanosoma cruzi infection.* **Immunology and Medic Microbiology**, 2004; 41:69-77.
41
- 42 [23] Sestili P; Martinelli C; Colombo E; Barbieri E; Potenza L; Satini S; Fimognari C. *Creatine*
43 *as an antioxidant.* **Amino Acids**, 2011; 40(5):1385-96.
44
- 45 [24] Lawler JM; Barnes WS; Wu G; Song W; Demaree S. *Direct antioxidant properties of*
46 *creatine.* **Biochem Biophys Res Commun**, 2002; 290(1):47-52.
47 [25] Li Y; Miao LY; Xiao YL; Cai HR; Zhang DP. *Elevated platelets enhance cancer cell*
48 *migration promote hematogenous metastasis and associate with a poor prognosis in*
49 *advanced non-small cell lung cancer cases.* **Asian Pac J Cancer Prev**, 2014; 15(1):139-43.
50
- 51 [26] Debeljak N; Solar P; Sytkowski AJ. *Erythropoietin and cancer: the unintended*
52 *consequences of anemia correction.* **Frontiers in immunology**, 2014; 5:5632
53
- 54 [27] Newland AM; Black CD. *Tumor progression associated with erythropoiesis-stimulating*
55 *agents.* **Ann Pharmacother**, 2008; 42(12):1865-70.

[28] Qasim N; Mahmood R. *Diminution of oxidative damage to human erythrocytes and lymphocytes by creatine: possible role of creatine in blood.* **PLoS One**, 2015; 10(11):e0141975. doi:10.1371/journal.pone.0141975.

Table 1. Characterization of cachexia model and response to creatine supplementation in control (C), tumor-bearing followed by 5 days after implantation (T5); tumor-bearing followed by 10 days after implantation (T10); tumor-bearing followed by 5 days after implantation treated with creatine (TCr5); and tumor-bearing followed by 10 days after tumor implantation treated with creatine (TCr10).

	C	T5	TCr5	C10	T10	TCr10
Δ weight (g)	17.33 ± 3.08	-9.16 (A) ± 1.47	14.01 (B) ± 4.23	45.17 ± 8.98	-31.17 (A) ± 4.21	15.05 (B) ± 2.97
% weight variation	7.13 ± 1.23	-3.45± 0.47 (A)	5.47 (B) ± 1.62	18.53 ± 5.21	-10.69 (A) ± 1.31	6.01 (B) ± 1.71
Tumor (g)	-	3.8 ± 0.48	3.1 (ns) ± 0.43	-	11.73 ± 2.17	8.37 (B) ± 0.77
Food intake (g)	17.82 ± 0.22	13.88 (A) ± 1.51	17.24 (B) ± 0.41	17.97 ± 0.18	12.29 (A) ± 0.81	16.18 (B) ± 0.52
<i>Gastrocnemius</i>						
Weight (mg)	1178 ± 77	932 (A) ± 115	1137 (B) ± 50	1299 ± 41	841 (A) ± 66	1089 (B) ± 74
% relative gastrocnemius/body weight	0.47 ± 0.03	0.37 (A) ± 0.06	0.43 (ns) ± 0.04	0.44 0.02±	0.32 (A) ± 0.03	0.43 (B) ± 0.04

Data are presented as mean and standard deviation. Letter (A) means that is statistically different when compared to control and letter (B) when compared to T group (ANOVA with Bonferroni's *post-hoc test*).

Table 2. Quantification of red blood cells and platelets and response to creatine supplementation in control (C), tumor-bearing followed by 5 days after implantation (T5); tumor-bearing followed by 10 days after implantation (T10); tumor-bearing followed by 5 days after implantation treated with creatine (TCr5); and tumor-bearing followed by 10 days after tumor implantation treated with creatine (TCr10).

	C	T5	TCr5	T10	TCr10
Hematocrit (%)	42 [41.25 – 46]	36.5 (A) [36 – 38]	49 (B) [46.75 – 50]	32.5 (A) [21 – 34]	42 (B) [40 – 44]
Reticulocytes (%)	3.6 [3.3 – 3.8]	5.2 (A) [5.0 – 5.8]	3.0 (B) [2.0 – 3.3]	6.4 (A) [6.1 – 6.5]	3.1 (B) [2.3 – 4.2]
Platelets (10⁹/mm³)	4500 [4000 – 4775]	9000 (A) [8700 – 9225]	6350 (B) [6225 – 6550]	4500 [4275 – 5550]	4700 [4350 – 4975]

Data are expressed in median [percentile 25- 75]. Differences were detected by means of Kruskal-Wallis followed by Dunn's *post-hoc test*. Letter (A) means that is statistically different when compared to control and letter (B) when compared to T group.

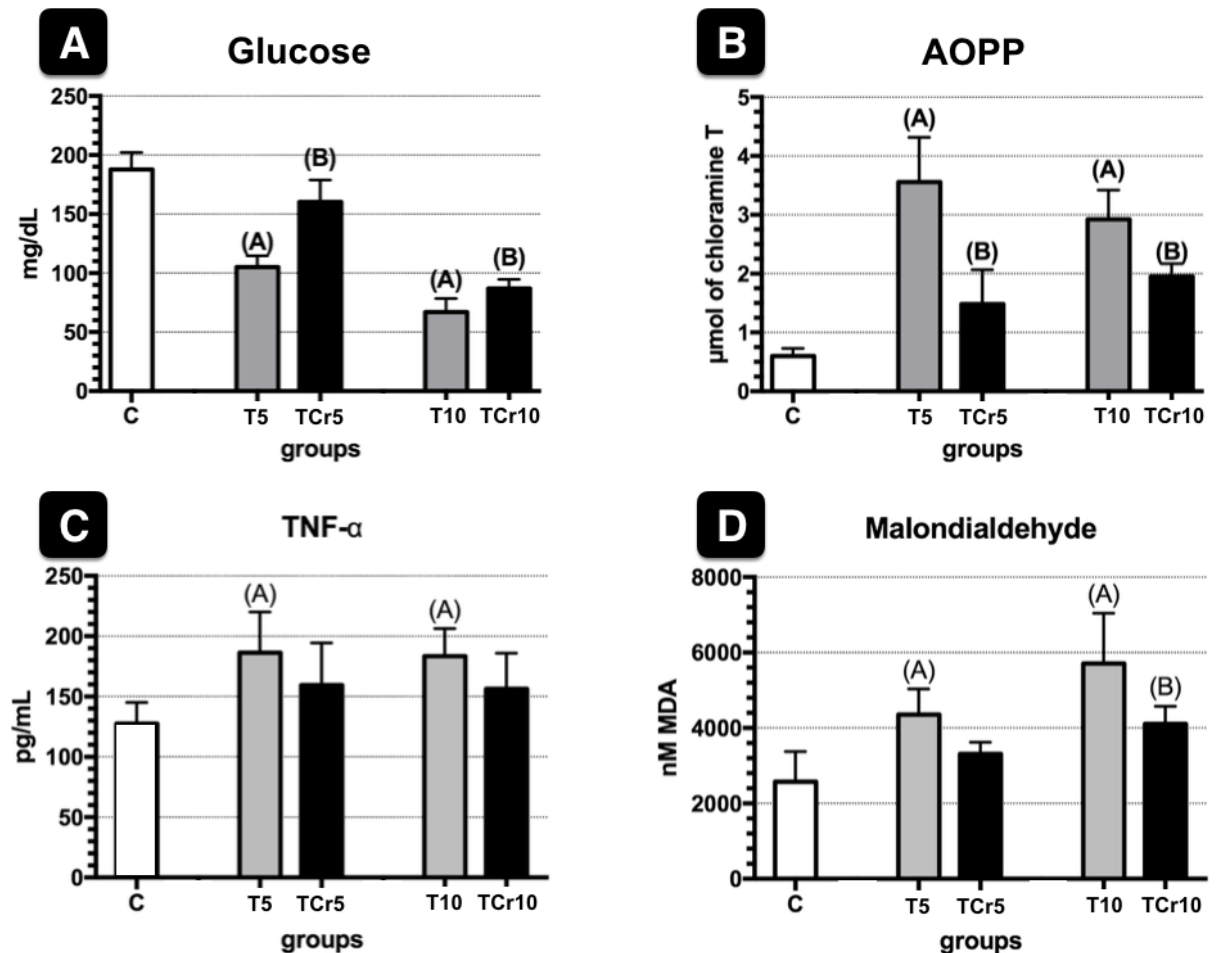
Table 3. Quantification of white blood cells and response to creatine supplementation in control (C), tumor-bearing followed by 5 days after implantation (T5); tumor-bearing followed by 10 days after implantation (T10); tumor-bearing followed by 5 days after implantation treated with creatine (TCr5); and tumor-bearing followed by 10 days after tumor implantation treated with creatine (TCr10).

	C	T5	TCr5	T10	TCr10
Leukocytes (10⁹/mm³)	81.50 [76.0 - 90.5]	180.5 (A) [140.0 - 184.75]	248.0 (B) [201.0 - 264.0]	142.0 (A) [137.0 - 195.5]	263.0 (B) [206.0 - 285.75]
Lymphocytes	41.5	64.77	58.82	72.33 (A)	69.85

($10^2/\text{mm}^3$)	[33.39 - 49.51]	[49.5 - 71.41]	[46.46 - 64.0]	[64.85 - 78.19]	[67.25 - 81.36]
Neutrophils	28.82	95.49 (A)	168.58 (B)	47.84	151.29 (B)
($10^2/\text{mm}^3$)	[27.48 - 34.03]	[91.6 - 99.55]	[15.05 - 176.77]	[41.1 - 63.45]	[124.28 - 173.92]
Monocytes	6.61	17.9 (A)	21.18	15.3 (A)	21.3 (B)
($10^2/\text{mm}^3$)	[5.15 - 7.2]	[14.88 - 19.91]	[19.2 - 24.04]	[12.69 - 17.16]	[20.7 - 22.72]

1 Data are expressed in median [percentile 25- 75]. Differences were detected by means of
 2 Kruskal-Wallis followed by Dunn's *post-hoc* test. Letter (A) means that is statistically
 3 different when compared to control and letter (B) when compared to T group.
 4
 5

Figure 1



6
 7 **Figure 1.** Systemic parameters and response to creatine supplementation in control (C), tumor-
 8 bearing followed by 5 days after implantation (T5); tumor-bearing followed by 10 days after
 9 implantation (T10); tumor-bearing followed by 5 days after implantation treated with creatine (TCr5);
 10 and tumor-bearing followed by 10 days after tumor implantation treated with creatine (TCr10). Data
 11 are presented as mean and standard deviation. Letter (A) means that is statistically different when
 12 compared to control and letter (B) when compared to T group (ANOVA with Bonferroni's *post-hoc*
 13 test).
 14
 15

APÊNDICE B

16 Time-dependent oxidative, proteolytic and muscle modifications in the heart in
 17 animals with cachexia induced by tumor-bearing and supplemented with creatine.
 18
 19

1 Fernando Henrique Borges¹, Poliana Camila Marinello², Juliana Garcia³, Alessandra
2 Lourenço Cecchini Armani², Camila de S Padilha⁴, José Alberto Ramos Duarte³,
3 Rafael Deminice⁴, Flávia Alessandra Guarnier^{*5}, Rubens Cecchini¹.
4
5
6

7 ¹Laboratory of Pathophysiology and Free Radicals, Department of General
8 Pathology, 86051-990, Londrina, Brazil.

9 ²Laboratory of Molecular Pathology, Department of General Pathology, 86051-990,
10 Londrina, Brazil.

11 ³Laboratory of Biochemistry, 4200-450, University of Porto, Porto, Portugal.

12 ⁴Department of Physical Education, 86051-990, Londrina, Brazil.

13 ⁵Laboratory of Pathophysiology and Muscle Adaptation, Department of General
14 Pathology, 86051-990, Londrina, Brazil.
15
16

17

18

19

20

21 ***Corresponding author:**

22 Flávia A. Guarnier

23 Laboratory of Pathophysiology of Muscle Adaptations

24 Department of General Pathology

25 Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445, km 380,

26 Campus Universitário

27 e-mail: faguarnier@uel.br

28 Phone/Fax +55-43-33714267

29 86051-990 Londrina, Brazil
30

31 **Abstract**

32 **Aim:** To evaluate effects of creatine supplementation during cachexia progression, in
33 hearts of rats bearing the solid form of Walker 256 carcinosarcoma.

34 **Methods:** Male rats were divided into 5 groups: 1:control (C); 2 and 3:tumor-bearing
35 (T – $8,0 \times 10^7$ cells in 0.3 mL PBS, implanted i.m. on the right flank) followed by 5 or

1 10 days; 4 and 5:tumor-bearing supplemented with creatine (TCr – tumor
2 implantation followed by creatine supplementation - 8g/L, drinking water) followed by
3 5 or 10 days. Electrocardiogram was performed and after death the four heart
4 chambers were separated and analyzed. Wall thickness, proteolytic activity,
5 myoplasmic calcium staining and oxidative stress were performed to evaluate
6 differences among chambers during tumor progression, and after supplementation.

7 **Results:** Tumor implantation promoted loss of general body weight. The significant
8 increasing on heart weight was probably due to increasing in left ventricle weight and
9 thickness, although right ventricles demonstrated decreasing measures of both
10 parameters. Creatine significantly recovered these values. In ECG, significant
11 increase in heart rate in T5 and T10 was showed, besides reduction in P and
12 inversion in T waves only in T10 were observed. Creatine positively modified these
13 alterations. Calcium concentration was also increased in cardiac tissue of tumor-
14 bearing animals as well as calpain proteolytic activity. Analysis of oxidative stress
15 showed increased lipid peroxidation, carbonylation of proteins and malondialdehyde,
16 which were all equally prevented by creatine supplementation.

17 **Conclusion:** Creatine supplementation is capable of attenuating main heart
18 functional, proteolytic and oxidative alterations during tumor development, appearing
19 as a possible therapeutic option in cardiac-related cachexia.

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30 **Introduction**

31 Cachexia is a multifactorial syndrome associated with loss of muscle mass due
32 to accelerated breakdown and reduction of protein turnover [1-2]. In this sense, the
33 constant decrease in protein content as a major characteristic of cachexia, involving
34 not only the skeletal muscle but also cardiac proteins, resulting in import changes in

1 heart performance. This condition is known as cachexia-related cardiac atrophy [3].
2 Some studies have reported loss of heart muscle mass during the cachexia
3 progression in rats bearing the ascitic form of Yoshida hepatocarcinoma [4-5] and
4 solid form of Walker-256 carcinosarcoma [6]. Heart present loss of mass and function
5 failure inducing, through, decreased survival [7]. More recent evidences indicate that
6 heart mass loss in cardiac cachexia have similarities with skeletal muscle mass loss
7 by increasing proteolytic pathways. Additionally, imbalance between protein
8 synthesis and breakdown has been report in favor of the later [8]. Previous results
9 from our group [9] pointed to the involvement of oxidative stress as a modulator of
10 cardiac atrophy induced by cachexia, being left and right ventricles modulated
11 independently and on a different manner. Once the metabolic demands within the
12 two heart sides generates different levels of oxidative stress, the proteolytic pathways
13 are differentially activated, influencing directly the increasing or decreasing of wall
14 thickness.

15 During the last years creatine has received considerable attention due to
16 innumerable mechanisms that may contribute to beneficial effects, such as (I)
17 increasing in energy potential of cells and preservation of muscle glycogen, (II)
18 antioxidants effects, (III) decrease of muscle calcium levels and (IV) reduction of
19 apoptosis [10-11] Tisdale *et al.*, 2010 [12] and Stimpson *et al.*, 2013 [13] evidenced
20 that creatine supplementation is able to attenuate loss of mass in skeletal muscle,
21 bringing it as a promising therapy in several diseases with muscle mass loss
22 component [14]. In this line, the present study tested the effect of creatine
23 supplementation in right and left ventricles contractility, oxidative stress and
24 proteolysis during the progression of cancer-induced cachexia. Our results indicate
25 that creatine has a protective effect in all parameters evaluated, being more
26 consistent after 10 days after tumor inoculation and supplementation.

27

28

29

30 **Methods**

31 *Animals and experimental design*

32 Adult male Wistar rats (initial weight ~200-250 g) were obtained from the animal
33 house of the biological sciences center from State University of Londrina, Brazil. All
34 procedures were conducted in complete conformance with the Guide for the Care

1 and Use of Laboratory Animals [DHEW Publication No. (NIH) 86-23, revised 1985;
2 Office of Science a Health Reports, DRR/NIH, Bethesda, MD} and were also
3 approved by the institutional ethics comitte (nº 204/2014). In addition, animals
4 received commercial food (CR Nuvilab® Nuvital®) *ad libitum* and were housed in
5 collective cages on a 12h light/dark cycle at a mean temperature of 22°C. After three
6 days of acclimatization, rats were randomly divided into five groups designated as:
7 control (C, $n=20$), tumor-bearing followed by 5 days after tumor inoculation (T5,
8 $n=20$); tumor-bearing followed by 10 days after tumor inoculation (T10, $n=20$); tumor-
9 bearing followed by 5 days after tumor inoculation supplemented with creatine (TCr5,
10 $n=20$); and tumor-bearing followed by 10 days after tumor inoculation supplemented
11 with creatine (TCr10, $n=20$). The creatine used as supplement (Creatine Powder,
12 Universal Nutrition®, 93% purity) was diluted in filtered mineral water (8 g/L) and
13 ofered to treated groups during all the experimental periods (5 and 10 days). In order
14 to guarantee any contamination, all the bottles with the solution were replaced every
15 2 days.

16

17 *Tumor Inoculation and wasting loss parameters*

18 Tumor cells were maintained in our laboratory as an ascitic intraperitoneal
19 tumor (2×10^6 cells/0.5 mL PBS). At the moment of inoculation, tumor cells were
20 removed from the peritoneal cavity (with $8\mu\text{L/mL}$ of 5000 IU/mL heparin) and
21 centrifuged at $1000 \times g$, when the intermediate phase was collected. The percentage
22 of viable cells was determined by trypan blue dye exclusion (nonviable cells stained
23 blue), using a Neubauer chamber counting method. Control group received 300 μL of
24 phosphate-buffering saline (PBS – vehicle for cells) injected intramuscularly into the
25 right upper hindlimb. The tumor-bearing groups received a Walker-256 tumor cells
26 suspension (8×10^7 cells in 300 μL of PBS) injected intramuscularly into the right
27 upper hindlimb.

28 On days 5 and 10 after the implantation or PBS administration, all the animals were
29 anesthetized with ketamine/xylazine mixture (100 mg/kg and 160 mg/kg
30 intramuscular injection respectively), suffered toraxical cavity opening to collect the
31 heart, and then they were euthanized by decapitation under anesthesia. In addition,
32 tumors were also carefully excised and weighed. The estimation of total body weight
33 loss was calculated and considered in order to determine a pattern of general
34 wasting [15].

1

2 *Electrocardiographic register (ECG)*

3 One day before tumor inoculation and creatine supplementation start, the
4 electrocardiographic register was performed in groups T10 and TCr10 at 0, 4 and 9
5 days. Animals were anesthetized with a xylazine/ketamine mixture (8 / 50 mg/kg) and
6 accommodated on a marble surface containing styrofoam rubberized to avoid contact
7 with any electrical conduction. In sequence, chests were trichotomized for electrode
8 positioning. The free-electrolytic carbopol gel conductive was applied in inguinal and
9 subaxilar surfaces, and then clamps were plugged. The last electrode was applied on
10 chest for last clamp plug. After stabilization signals, the registers were taken for 180
11 seconds using a veterinarian electrocardiograph (DL650® by Delta Life).

12

13 *Heart mass loss and adaptation*

14 After euthanasia, hearts were taken, weighed, and fastly washed in KCl 1.15%
15 for blood excess removal and dried in filter paper. Part of the hearts ($n=12$) were
16 divided in right and left atrium and right and left ventricles, immediately frozen,
17 pulverized in liquid nitrogen and then stored at -80°C for further analysis and the
18 septum was discarded. The other part of the hearts collected ($n=8$) were immediately
19 washed in potassium chloride solution 19.1% and placed in 10% buffered formalin at
20 8°C for 24 hours, dehydrated with graded ethanol and embedded in paraffin blocks,
21 following procedures to morphometric analysis. Thus, to evaluate wall thickness,
22 sections including the parts of interest were cut by transverse semi-serial sections
23 into $5\ \mu\text{m}$, placed 5 cuts/slide, and stained with hematoxylin and eosin (HE). Images
24 were captured at light microscope (Zeiss Discovery V8 with AxioCam ERC5s) at 10x
25 magnification. These images were used to determine the average thickness of the
26 walls using Image-Pro Plus® 4.5 software (Media Cybernetics, Rockville, USA). For
27 each cut, 5 non-coincident measurements were performed. For calcium observation,
28 Von Kossa staining [16] was assayed ($6\ \mu\text{m}$ – 4 cuts/slide). The procedure is based
29 on the identification of calcium deposits in cytosol of tissues by means of calcium
30 salts reduction by ultraviolet light, and identified by silver salts. Images were captured
31 at photomicroscope at 200x magnification (Zeiss Axio Imager A1 – AxioCam MRc5)
32 and ImageJ 1.51m9 software was used to analyze the percentage of area stained
33 (Wayne Rasband National Institute of Health, USA).

34

1 *Creatine incorporation in cardiac tissue*

2 To test if the creatine consumed reached and was incorporated by the heart,
3 the amount of creatine in cardiac tissue was determined by Jaffe's reaction using a
4 method adapted from Taussky (1954) [17] and De Saedeleer & Marechal (1984) [18].
5 100 mg/mL (phosphate buffer 10 mM pH 7.4 NaCl 0.9%) of cardiac tissue was
6 homogenized and heated to convert creatine to creatinine, which reacts with picric
7 acid forming a reddish complex that is measured spectrophotometrically. For the
8 assay, 600 μ L of 44.4 mM picric acid were added to 200 μ L of the sample and
9 homogenized. From each sample, 300 μ L were added to two tubes containing 300
10 μ L distilled water (A1 and B1). After heating one (A1) to 100 $^{\circ}$ C for 1h 30 min in a
11 sealed vial, 1 mL of buffer solution containing 208 mM-sodium hydroxide, 12.7 mM-
12 sodium tetraborate and a surfactant was added to all samples (A1 and B1). Readings
13 were obtained with a spectrophotometer at 510 nm after incubation at 37 $^{\circ}$ C for 10
14 min in a water-bath. Absorbances were defined as A1 and B1. After the addition of
15 100 μ L of 11.4 mM-acetic acid and incubation at room temperature for 5 min,
16 readings were once again obtained and absorbances defined as A2 and B2. Creatine
17 concentration was calculated by the formula $(A1 - B1) - (A2 - B2)$ using a standard
18 curve of 5 to 1000 mM-creatinine carried out in triplicate. Free creatine was determined
19 by the procedure described above. Total cardiac creatine was determined by
20 phosphocreatine hydrolysis. For this procedure, 300 μ L of cardiac homogenate were
21 heated to 65 $^{\circ}$ C for 10 min in 0.4 mM-HCl and neutralized with 2 mM-NaOH, followed
22 by the creatine measurement procedure described above. Total creatine
23 corresponded to the sum of free creatine and phosphocreatine.

24

25 *Oxidative damage*

26 Chemiluminescence stimulated by tert-butyl hydroperoxide (CL) was
27 conducted as described by Gonzalez-Flecha *et al.*, (1991) [19]. To estimate the total
28 oxidative modification to the membranes in the tissue, reaction mixtures were placed
29 in 2 mL luminescent tubes containing the following: tissue homogenates (10mg/mL in
30 $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ buffer with 120mM KCl, pH 7.4), and 3mM tert-butyl hydroperoxide
31 in a final volume of 1mL. The hydroperoxide-initiated chemiluminescence (CL)
32 reactions was performed on a luminometer (TD 20/20, Turner Designs, California),
33 with a response range of 300-650 nm. The tubes were kept in the dark until the
34 assay, which was performed at 34 $^{\circ}$ C [19-20]. For each sample was constructed a 30

1 min curve, where each point represented the differential smoothing of 300 readings,
2 obtained by interpolation. The results were expressed in relative light units/g of tissue
3 (RLU/g tissue).

4 Lipid peroxidation and the ability of adduct formation between lipid
5 peroxidation end-products and proteins was assayed by the quantification of
6 thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). Malondialdehyde (MDA) formed
7 during peroxidation reacts with thiobarbituric acid (TBA) to generate a colored
8 product, a (TBA)₂-MDA adduct. In acid solution, (TBA)₂-MDA absorbs light at 532nm
9 and is readily extractable into organic solvents such as butan-1-ol. MDA levels were
10 measured, and the results were expressed in nmol/g tissue, as described previously
11 [20].

12 Carbonyl protein content, that reflects the amount of oxidized proteins and
13 consequently the potential of being degraded, was measured according to the
14 method described by Reznick & Packer (1994) [21], with modifications.
15 Approximately 200 mg samples were placed in glass homogenization tubes
16 containing 4 mL of homogenization buffer (50 mM phosphate buffer, 1 mM EDTA, pH
17 7.4). Tissue samples were homogenized and incubated for 15 min in an ice bath. The
18 samples were centrifuged at 3,000xg for 10 min at RT, and 1 mL of each protein
19 extract was placed in a glass tube. A volume of 4 mL of 2,4-dinitrophenylhydrazine
20 (DNPH) solution prepared in 2.5 N HCl was added to each tube, and the reaction
21 mixtures were incubated for 1 h at RT, with vortexing every 15 min. Next, the
22 samples were washed with 5 mL of 20% TCA (w/v) and centrifuged for 10 min to
23 collect the protein precipitates. Another wash was performed using 10% TCA, and
24 the protein pellets were dispersed mechanically. Finally, the pellets were washed 3
25 times with 4 mL ethanol-ethyl acetate (1:1, v/v) to remove free DNPH and lipid
26 contaminants. The final precipitates were dissolved in 2 mL of 6 M guanidine
27 hydrochloride, and any insoluble materials were removed by additional rounds of
28 centrifugation. The carbonyl content was calculated by reading the peak absorbance
29 of the DNPH-treated samples at 355–390 nm and compared to that of samples
30 treated with only 2.5 M HCl. The carbonyl concentration was calculated using the
31 following formula: $C = \text{Abs (355–390 nm)} \times 45.45 \text{ nmol/mL}$, where C is the
32 concentration of DNPH/mL, and 45.45 its absorption coefficient. The procedures
33 were performed in an ice bath until the TCA wash. Carbonyl content was expressed
34 in nmol/mg total protein.

1 *Proteolytic activity parameters*

2 Chymotrypsin-like proteolytic activity was quantified using a Proteasome Glo™
3 Chymotrypsin-like Cell Based Assay kit (Promega, Madison, WI, USA). This kit
4 estimates the activity of the proteasome; the final objective is to evaluate whether
5 proteolytic activity is present in different parts of the heart. The assay involves the
6 use of a specific luminogenic substrate (succinyl-leucine-valine-tyrosine-
7 aminoluciferin) to determine chymotrypsin-like activity. Proteasome cleavage of the
8 substrate produces a luminescent signal from the luciferase contained in the reaction
9 medium. The three major proteolytic activities (chymotrypsin-like, trypsin-like, and
10 post-glutamyl peptide hydrolytic or caspase-like activity) occurring within the 20S
11 core of the 26S proteasome complex are responsible for most of the protein
12 degradation, which includes degradation of damaged cellular proteins. Therefore, this
13 coupled-enzyme system, with simultaneous proteasome cleavage of substrate and
14 luciferase consumption of the released aminoluciferin, results in a luminescent signal
15 that can be considered proportional to the amount of proteasome activity in the
16 muscle tissue.

17 For the assay, 25 mg of heart powder was added to 1 mL 10 mM KH₂PO₄, pH
18 7.4, in 0.9% NaCl and gently homogenized. Fifty microlitres of the resulting muscle
19 homogenate was pipetted in duplicate onto 96-well microplates, and the final reagent
20 mixture with luminescent substrate was added to the medium. After 5 min, under light
21 protection, the luminescent signal at the plate was detected with a Glo-Runner
22 microplate reader luminometer (Turner Designs), and the results were expressed as
23 percent relative to control.

24 In a similar manner, the activity of a calcium-dependent protease was
25 measured by a chemiluminescence assay using a Calpain-Glo™ Protease Assay kit
26 (Promega; Madison, WI, USA). Homogenates were prepared at a concentration of
27 6.25 mg/mL 10 mM KH₂PO₄ buffer, pH 7.4, in 0.9% NaCl. The luminescent signal is
28 proportional to the calcium-dependent proteolytic activity in samples, which is also
29 based on the specific reaction of the labelled luciferin substrate by the enzyme
30 luciferase. The results are expressed as RLU per milligram tissue.

31 When normalization by total protein content was needed, Lowry's method (1951) [22]
32 modified by Miller (1959) [23] was used. This method involved the use of bovine
33 serum albumin (BSA) as a standard.

1

2 *Statistical analysis*

3 In all data sets, statistical analysis is described in the legend of each figure.
4 The level of significance was adjusted to $\alpha < 0.05$. OriginLab Pro® 9.0 SR2,
5 GraphPad Prism® 7, Numbers® 3.6 and Microsoft Excel® 365 softwares were used
6 for data processing.

7

8 **Results**9 *Characteristics of experimental design*

10 Table 1 shows the variation of body weight ($\Delta = \text{final} - \text{initial}$), tumor weight,
11 tumor-bearing rats at 5th and 10th days after tumor implantation, and tumor-bearing
12 rats supplemented with creatine. As expected, the tumor progression lead to
13 significantly decrease in the total body mass (T5: $-15.2 \pm 4.7\text{g}$ and T10: $-23.9 \pm 8.5\text{g}$)
14 when compared to control. Accordingly, significant increase of tumor weight was also
15 observed (T5: $3.9 \pm 0.9\text{g}$ and T10: $10.9 \pm 2.1\text{g}$). On the other hand, the creatine
16 supplementation was able to avoid total body weight loss (TCr5: $12.2 \pm 6.4\text{g}$ and
17 TCr10: $12.4 \pm 5.8\text{g}$). The progression of tumor weight was also avoided (TCr5:
18 $3.6 \pm 1.2\text{g}$ and TCr10: $8.5 \pm 1.6\text{g}$), but creatine supplementation was capable reducing
19 the tumor mass only in 10 days (22.02%). This table also demonstrates the total
20 weight of heart, ventricles, and atriums. There were no significant differences
21 between groups for total weight of heart, left ventricles and atriums after tumor
22 implantation. However, the right ventricle presented significant reduction in T5 (78mg
23 [76-84]) and T10 (73mg [66-77]) when compared with C (101 mg [93-108]). In
24 addition, rats hearts that received creatine supplementation responded to treatment,
25 mitigating the decrease in right ventricular mass (7.9% in 5 days and 23.7% in 10
26 days).

27 Since atriums did not demonstrate any observable difference. Table 3 shows
28 ventricles morphometry and the relation with electrocardiogram parameters. We only
29 observed significant increase on left thickness on T5 compared with C group. T10
30 seems to readapt to normal values. Paradoxically, we observed a significant
31 decrease of right ventricles thickness on T5 and T10 (-24.5% and -53.3%
32 respectively) when compared to C. When tumor groups were under creatine
33 supplementation, no decrease in right wall thickness was detected in comparison
34 with C.

1

2

(--- table 1 ---)

3

4 The parameters related to the creatine supplementation effectiveness are
5 presented on Figure 1. We observed that in all groups that received the
6 supplementation (TCr5 and TCr10), total and free creatine demonstrated to be
7 increased ($993.5 \pm 97.6 \mu\text{mol/L}$ and $1094.0 \pm 69.6 \mu\text{mol/L}$ for total, and
8 $648.0 \pm 41.0 \mu\text{mol/L}$ and $692.2 \pm 55.2 \mu\text{mol/L}$ for free, respectively) when compared to
9 the control ($729.7 \pm 135.1 \mu\text{mol/L}$ for total, and $451.0 \pm 80.8 \mu\text{mol/L}$ for free creatine).
10 Interestingly, T5 showed reduction in creatine phosphate (53,85%), presenting levels
11 similar to control on T10.

12

(--- figure 1 ---)

13

14 *Cardiac parameters*

15 Figure 2A, represent the morphometry and ECG were performed. We can see
16 in heart rate, a significant increase in T5 ($298.8 \pm 9.98 \text{ bpm}$) and T10 (309.8 ± 10.5
17 bpm) groups in the comparison to C was found (Figure 2B). Following the results
18 from P wave, is easily observed decrease in time of P wave (Figura 2C) in 10 days
19 (60%). In the same manner, QRS complex, representing the depolarization of the
20 ventricles (Figure 2D), presented significant increase in T5 (54.28%) when compared
21 with group C. In Figure 2E is possible observe inversion of T wave. Creatine
22 supplementation were able to prevent all parameters.

23

24

(---Figure 2---)

25

26 The Figure 3A represent qualitatively the coloration by Von Kossa. we can see
27 increased concentrations of calcium in tumor groups. When analyzed quantitatively,
28 we found 52.96% in 5 days and 50.63% in 10 days with compared to control group in
29 right ventricle. In the left ventricle we can also find increased concentration in 5 days
30 (46.83%) and 10 days (48.17%). Creatine supplementation was able prevent calcium
31 concentration from increasing. The figure 3 shows calpain-like activity (3D) in RV and
32 LV, and proteasome-like activity (3DE) in RV and LV. There was significant increase
33 of Calpain-like in RV (T5: 508.7 ± 67.9 and T10: $630.2 \pm 146.6 \text{ URL/mg protein}$), while
34 in LV (T5: 160.6 ± 11.78 and T10: $659.3 \pm 166.1 \text{ URL/mg protein}$). However, the

1 creatine supplementation shows significant decrease in RV (TCr5: -55.45 ± 6.28 and
 2 TCr10: 146.6 ± 26.87 URL/mg protein), while in LV (TCr5: -62.45 ± 10.66 and TCr10:
 3 348.7 ± 81.39 URL/mg protein). We observed significant upregulation of proteasome-
 4 like activity in RV in T5 (25.45 ± 6.06 URL/mg protein) but we cant observe in T10 (-
 5 28.64 ± 12.53 URL/mg protein). In LV is easily to see the same profile in T5
 6 (62.15 ± 12.08 URL/mg protein) and T10 (-37.69 ± 9.92 URL/mg protein) .
 7 Nevertheless, for this parameter the creatine supplementation was not able to
 8 attenuate the proteasome-like activity in RV in TCr5 (61.29 ± 12.99 URL/mg protein)
 9 and TCr10 (17.78 ± 4.13 URL/mg protein). On the other hand, a significant
 10 downregulation was not observed in LV in TCr5 (68.98 ± 10.69 URL/mg protein) but
 11 the LV in TCr5 shows significant upregulation (54.47 ± 7.39 URL/mg protein).

12

13

(---Figure 3---)

14

15 *Oxidative damage parameters*

16 Mean chemiluminescence stimulated by *tert*-butyl hydroperoxide curves from
 17 right (panel A) and left (panel B) ventricles are showed in Figure 4. Considering the
 18 right ventricle, lipid peroxidation demonstrated to be significantly increased in
 19 maximum curve point (T5: 1243.15 and T10: 1236.79 RLU/10mg tissue) groups
 20 compared with C. Accordingly, there were no significant modification in creatine
 21 supplemented (TCr5: 1218.29 and TCr10: 953.45 RLU/10mg tissue) when groups
 22 were compared to C. In relation to left ventricle, we can observe an increased
 23 maximum curve point in T groups (T5: 1407.79 and T10: 1147.83 RLU/10mg tissue)
 24 when compared to C group. On the other hand, groups with supplementation showed
 25 decrease in relation to T groups (TCr5: 1283.43 and TCr10: 1061.97 RLU/10mg
 26 tissue).

27 There was significant increase of CP in (T5: 9.443 [8.454–10.86] nmol/mg
 28 protein - RV; 7.988 [7.698–9.772] - LV and T10: 8.368 [6.177–9.381] nmol/mg protein
 29 - RV; T10: 9.361 [8.956–10.89] - LV) when compared to C group (3.749 [3.318–
 30 4.772] nmol/mg protein – RV; 4.981 [4.557–5.978] nmol/mg protein – LV). On the
 31 other hand, there were significant decrease of CP in creatine supplementation
 32 groups (TCr5: 4.954 [3.818–6.158] – RV; 5.613 [5.408–6.045] nmol/mg protein – LV
 33 and TCr10: 8.368 [6.177–9.381] – RV; 4.811 [3.972–5.425] nmol/mg protein – LV)
 34 compared with T group (Figure 4A and B).

1 To evaluate aspects related to oxidative stress and interaction with protein
2 damage, malondialdehyde (Figure 4, panels E and F), carbonylated proteins (Figure
3 4, panels C and D) were assayed in the right and left ventricles. As seen in
4 chemiluminescence assay, a significant increase in TBARS was observed in right
5 ventricle in T5 (5.490 [4.631–6.373] nmol/10mg tissue) and T10 (3.519 [3.466–4.801]
6 nmol/10mg tissue). Left ventricles demonstrated also increased values in both
7 experimental times (T5: 3.391 [2.226–3.502] nmol/10mg tissue; T10: 4.276 [2.949–
8 4.481] nmol/10mg tissue) when compared with C (1.782 [1.407–1.985] nmol/g tissue
9 – RV; 1.388 [1.303–1.548] nmol/g tissue – LV). Creatine supplementation also was
10 able to prevent the modifications (TCr5: 2.532 [2.348–2.957] nmol/10mg tissue – RV;
11 1.192 [0.610–1.317] nmol/10mg tissue – LV and TCr10: 1.801 [1.377–1.817]
12 nmol/10mg tissue – RV; 1.545 [1.340–2.388] nmol/10mg tissue – LV.

13

14

15

(---Figure 4---)

16

17

18 **Discussion and conclusion**

19 During the tumour development, several metabolic modifications occur, and
20 the most important is the lean mass loss, known as cachexia [24]. In tumour-bearing
21 rats with Walker-256 cells, implanted in their upper hindlimb for the development of
22 its solid form, it's possible to observe the mass loss as early in 5 days. However,
23 serious consequences may occur in other organs, indicating the heart as one of the
24 most affected in cachexia syndrome after the skeletal muscle [25], but few studies
25 have associated tumor development with loss of cardiac mass (Barreiro *et al.*, in
26 2005 [4] reported 18% of loss and Marin-Corral *et al.*, in 2010 [5], 23% of loss in
27 mouse with Yoshida AH-130 ascite tumor) among these, the association with
28 oxidative stress becomes even smaller.

29 Although, results of mass of the atrium (mg) presented, there was no
30 differences between groups in any parameter analyzed. Creatine supplementation
31 has been widely used as an alternative to minimize the effects of distinct
32 cardiovascular diseases [14; 26; 27; 28]. According to Wyss & Kaddurah-Daouk
33 (2000) [30], creatine has the function of quickly providing energy due to the transfer
34 from a N-phosphoryl group from creatine phosphate (CP) to ADP molecule, restoring

1 ATP molecule through the catalysis from creatine kinase (CK). It's also responsible to
2 transfer energy from the mitochondria to cytosol with the aid CK isoforms (CK-MM –
3 skeletal muscle; CK-MB – heart; CK-BB – brain). Thus, the CP-CK system assists
4 improving the mitochondrial respiration in ATP/ADP ratio, decreasing ADP
5 concentration. In oxidative stress, several articles describe antioxidant action, in PH
6 maintenance, through the H⁺ ions buffering and glycogenolysis activation with better
7 glucose availability, providing more energy.

8 Based on the studies mentioned above and also on possible mechanisms
9 described, we chose to use creatine supplementation in order to try to minimize cardiac
10 mass loss and the deleterious effects that tumour can cause to the skeletal and
11 cardiac muscle. To evaluate the functionality of the heart, it was used cardiac
12 conduction exam or electrocardiography to record potential changes in conduction of
13 electrical impulses. In literature, few articles use this artifice [6] by the high frequency
14 presented in rats, which hampers the interpretation. We chose to use aVF derivation
15 because it shows a P-QRS-T complex more distinctly. The derivation II, widely used,
16 presented an anesthesia interference (R' and R'' – data not shown). Although
17 literature shows heart beats above 350/min, in our study, lower levels were found (C:
18 255±29), and this may be related to the anesthesia dosage used. However, the
19 Animal Care and Used Committee (from Johns Hopkins University) shows values
20 ranging from 330-480bpm [33] and in Manual for Animal Care in Research (from
21 Federal University of Rio Grande do Sul), available online [34], varies between 250-
22 450/min. As shown, there seems to be significant variations between localities, we
23 assume that animals in T and TCr groups are the same as in the C group, in other
24 words, they have their own controls, then, we should consider significant changes, if
25 case. Based on this supposition, animals showed tachycardia in 10 days after tumour
26 implantation, compared to the period which there was no intervention of tumour
27 development.

28 The P wave reflects the atrium depolarization followed by the atrial
29 contraction, and it was possible to observe the P-wave decreasing in animals with 10
30 days of tumour development. Changes in P wave are almost always associated with
31 the pulmonary hypertension [31] But, this noteworthy that we did not evaluate this
32 parameter in this article. QRS complex shows depolarization of the ventricles and the
33 beginning of contraction triggering the ventricular pressure increase. It is possible to
34 observe an increase during the execution time of the complex in 5 days in tumour

1 development. This increase may be characteristic of ventricular hypertrophy, since it
2 takes longer for all electrical charge dissipated [31]. Therefore, we should consider
3 the actual cardiac functional impairment during tumor development based on the
4 results found. Here it is interesting to enhance that creatine supplementation was
5 able to avoid cardiac involvement during tumour development.

6 Previous studies of our laboratory using the same model of tumor-induced
7 cachexia [9; 15] showed that carbonilated proteins and CL curves are similiar in
8 skeletal muscle and heart in 5 days of tumour development. Differences found
9 between both sides of heart were given to the differences in metabolic activities
10 demands, showing, one more time, that both ventricles work in independent ways.
11 Apparently creatine appears to have antioxidant effect, as some authors suggest,
12 however, there is no evidence of this characteristic It is expected that further studies
13 elucidate this possible effect.

14 A review has shown that reactive species can modulate the activation of
15 proteolytic pathway, for exemple, the calpains and ubiquitin-proteasome pathway.
16 However, moderate oxidate stress has been implicated in protein oxidation induction
17 with the possibility of intracellular proteolysis increasing. We can clearly see a
18 difference in a group of calpain with high levels of activation in RV and low levels in
19 LV. Once again, creatine supplementation was able to prevent the activation of
20 calcium-dependent pathway of calpain. Proteasomal activity seems not be influenced
21 by tumour supplementation, since both sides demonstrate the same profile,
22 appearing basal levels of protein degradation.

23 When this mass loss occurs in RV, the chamber is not able to support the
24 peripheral blood demand of organs, the LV attempts to compensate this loss by
25 becoming thicker and more oval. Creatine seems to influence directly the cardiac
26 metabolism, preventing modifications to occur. It was found in previous work, that
27 loss of RV mass may be associated with increase of calpain activity which seems to
28 be avoided by creatine supplementation. And, although both ventricles work
29 independently front to the different responses to the tumour, supplementation seems
30 to be able to avoid some changes, both on the oxidative stress level.

31 Recent studies have demonstrated the involvement of oxidative stress and/or
32 their final products in muscle atrophy [15; 35], as main inducer of proteins oxidation
33 causing proteolysis increasing [36], being by the growth of calcium release, wether

1 by sarcoplasmic reticulum, or, by sensitizing the muscle to the calcium exposure by
2 the hydrogen peroxide

3 As it can be seen, the peak of calpain coincides with the peak of carbonilated
4 protein and with increasing of the cell permeability measured by CL curve. Therefore,
5 the calcium release from sarcoplasmatic reticulum begins with a demand which
6 adapts to the condition and over time and turns out to be desensitized and
7 consequently reduces the calcium reabsorption by the sarcoplasmic reticulum [37].
8 This can be explained with the calcium increasing area presented in Von Kossa
9 stain. Despite of higher levels of lipid peroxidation and carbonilad proteins in LV they
10 do not seem to be able to modulate positively in proteolytic pathway front of the
11 metabolic demand.

12 Based in this, we conclude that creatine supplementation appears to be
13 effective in preventing effects caused by tumour development, reducing oxidative
14 damage that could lead cardiac dysfunction, and also being able to benefit several
15 physiological parameters.

16

17 REFERENCES

18

19 [1] Langsten, H. N.; Norton, J. A. 1991. Mechanisms of cancer cachexia. *Hematology/Oncology*
20 *Clinics of North America*, United States, v. 5, p. 103-123.

21 [2] Walsmith, J.; Roubenoff, R. Cachexia in rheumatoid arthritis. 2002. *International Journal of*
22 *Cardiology*, Amsterdam, v. 85, n. 1, p. 89-99, Sept.

23 [3] Argilés, J. M.; Busquets, S.; Felipe, A.; López-Soriano, F. J. 2005. Muscle wasting in cancer
24 and ageing: cachexia versus sarcopenia. *Advances in Gerontology*, Peterburg, v. 18, p. 39-54.

25 [4] Barreiro, E.; Puente, B.; Busquets, S.; López-Soriano, S. J.; Gea, J.; Argilés, J. M. 2005. Both
26 oxidative and nitrosative stress are associated with muscle wasting in tumor-bearing rats. *FEBS*
27 *Lett*, Netherlands, v. 579, n. 7, p. 1646-1652.

28 [5] Marin-Corral J, Fontes Cc, Pascual-Guardia S, Sanchez F, Olivan M, Argiles Jm, Busquets S,
29 Lopes-Soriano Fj, Barreiro E. 2010. Redox balance and carbonylated proteins in limb and heart
30 muscles of cachectic rats. *Antioxid Redox Signal*. 12:365-80.

31

32 [6] Toneto At, Ramos Laf, Salomao Em, Tomasin R, Aereas Ma, Gomes-Marcondes Mcc. 2016.
33 Nutrition leucine supplementation attenuates cardiac failure in tumor-bearing cachectic animals. *J*
34 *of Cachexia, Sarcop and Muscle*. 7:577-86.

35

36 [7] Springer J, Tschirner A, Haghikia A, Von Haehling S, Lal H, Grzesiak A Kaschina E, Palus S,
37 Potsch M, Von Websky K, Hocher B, *et al*. 2014. Prevention of liver cancer cachexia-induced
38 cardiac wasting and heart failure. *Europ Heart J*. 35:932-41.

39

40 [8] Manne Nd, Lima M, Enos Rt, Wehner P, Carson Ja, Blough E. 2003. Altered cardiac muscle
41 mTOR regulation during the progression of cancer cachexia in the ApcMin/+ mouse. *Int J Oncol*.
42 Jun:42(6):2134-40.

- 1
2 [9] Borges Fh, Marinello Pc, Cecchini Al, Blegniski Fp, Guarnier Fa, Cecchini R. 2014. Oxidative
3 and proteolytic profiles of the right and left heart in a model of cancer-induced cardiac cachexia.
4 *Pathophysiology*. 21:257-65.
5
- 6 [10] Tarnopolsky M, Martin J. 1999. Creatine monohydrate increases strength in patients with
7 neuromuscular disease. *Neurology*. 10;52(4):854-7.
8
- 9 [11] Tarnopolsky Ma. 2014. Creatine as a therapeutic strategy for myopathies. *Amino Acids*.
10 40(5):1397-407.
11
- 12 [12] Tisdale Mj. 2010. Reversing cachexia. *J Cell Biochem*. 10.1016
13
- 14 [13] Stimpson Sa, Leonard Ms, Clifton Ls, Poole Jc, Turner Sm, Shearer Tw, Remlinger Ks, Clark
15 Rv, Hellerstein Mk, Evans Wj. 2013. Longitudinal changes in total body creatine pool size and
16 skeletal muscle mass using the D3- creatine dilution method. *Springer-Verlag*.
17
- 18 [14] Gualano B; Roschel H; Lancha-Jr Ah; Brightbill Ce; Rawson Es. 2012. In sickness and in
19 health: the widespread application of creatine supplementation. *Amino Acids*. 43:519-29.
20
- 21 [15] Guarnier Fa, Cecchini Al, Suzukawa Aa, Maragno Algc, Simao Aanc, Cecchini R. Time
22 course of skeletal muscle loss and oxidative stress in rats with Walker-256 solid tumor. *Muscle &*
23 *Nerve*, 2010. Dec;42(6)950-8.
24
- 25 [16] Chaplin Aj, Grace Sr. Calcium oxalate and the von Kossa method with reference to the
26 influence of citric acid. *Histochemical Journal*, 1975. 7(1975):451-58.
27
- 28 [17] Taussky Hh. A microcolorimetric determination of creatine in urine by the Jaffe reaction. *J*
29 *Biol Chem*, 1954. 208:853-61.
30
- 31 [18] De Saedeleer M, Marechal G. Chemical energy usage during isometric twitches of frog
32 satorius muscle intoxicated with an isomer of creatine, beta-guanidinopropionate. *Pflugers Arch*,
33 1984. 404:185-9.
34
- 35 [19] Gonzalez-Flecha, B.; Llesuy, S.; Boveris, A. Hydroperoxide initiated chemiluminescence: an
36 assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver and muscle. *Free Radical Research*
37 *Communications*, New York, v. 10, p. 93-100, 1991.
- 38 [20] Oliveira Fja, Cecchini R. Oxidative stress of liver in hamsters infected with *Leishmania*
39 *chagasi*. *The J of Parasit*, 2000. 86(5):1067-72.
40
- 41 [21] Reznick Az, Packer L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl
42 assay. *Methods in Enzymology*, 1994. 233:357-363.
43
- 44 [22] Lowry, O. H.; Rosenbrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J. Protein measurement with the
45 folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, Baltimore, v. 193, p. 265-275, 1951.
- 46 [23] Miller, G. L. Protein determination for larger numbers of samples. *Analytical Chemistry*,
47 Washington, v. 31, n. 5, p. 964, May. 1959.
- 48 [24] Tisdale Mj. Cachexia in cancer patients. *Nat Rev Cancer*, 2002. 2:862-71.
49
- 50 [25] Argiles Jm, Busquets S, Felipe A, Lopez-Soriano Fj. Molecular mechanisms involved in
51 muscle wasting in cancer and ageing: cachexia versus sarcopenia. *The Int Journal of Biochem*
52 *and Cell Biol*, 2005. 37:1084-1104.
53

- 1 [26] Gualano B; Roschel H; Lancha-Jr AH; Brightbill CE; Rawson ES. In sickness and in health:
2 the widespread application of creatine supplementation. *Amino Acids*, 2012; 43:519-29.
3
- 4 [27] Gordon A; Hultman E; Kaijser L; Kristjansson S; Rolf CJ; Nyquist O; Sylven C. Creatine
5 supplementation in chronic heart failure increases skeletal muscle creatine phosphate and
6 muscle performance. *Cardiovasc Res*, 1994; 30(3):413-18.
7
- 8 [28] Neubauer S; Remkes H; Spindler M; Horn M; Wiesmann F; Prestle J; Walzel B; Ertl G;
9 Hasenfuss G; Wallimann T. Downregulation of the Na(?) - creatine cotransporter in failing human
10 myocardium and in experimental heart failure. *Circulation*, 1999; 100(18):1847-50.
11
- 12 [30] Wyss M, Kaddurah-Daouk R. Creatine and creatinine metabolism. *Physiological Reviews*,
13 2000. 80:1107-213.
14
- 15 [31] Thaler Ms. *The only EKG book: You'll never need*. Lippincott Williams & Wilkins, 2007.
16
- 17 [32] Dublin D. *Rapid interpretation of EKG's*. 6^a Edition. Cover Publishing Company, Hong Kong,
18 2006.
19
- 20 [33] Biotério da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre. Animais e
21 Cuidados. Disponível online em: <[https://www.ufcspa.edu.br/index.php/animais e cuidado](https://www.ufcspa.edu.br/index.php/animais_e_cuidado)>
22 acessado dia 23 de janeiro de 2018
23
- 24 [34] Johns Hopkins University. Animal Care and Use Program. Disponível online em:
25 <web.jhu.edu/animalcare/procedures/rat.html> acessado dia 23 de janeiro de 2018.
26
- 27 [35] Tonon J, Guarnier FA, Brunnuell CR, Bernardes SS, Cecchini AL, Cecchini R. Oxidative
28 status and chymotrypsin-like activity in right and left ventricle hypertrophy in na experimental
29 model of emphysema. *Pathophysiology* 20(2013) 249-56.
30
- 31 [36] Grune T, Davies Kj. The proteasomal system and HNE-modified proteins. *Molecular Aspects*
32 *of Medicine*, Elmsford, v. 24, n. 4-5, p. 195-204, 2003.
33
- 34 [37] Grune T, Merker K, Sandig G, Davies KJA. Selective degradation of oxidatively modified
35 protein substrates by the proteasome. *Biochemical and Biophysical Research Communications*,
36 New York, v. 305, p. 709-718, 2003.
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46

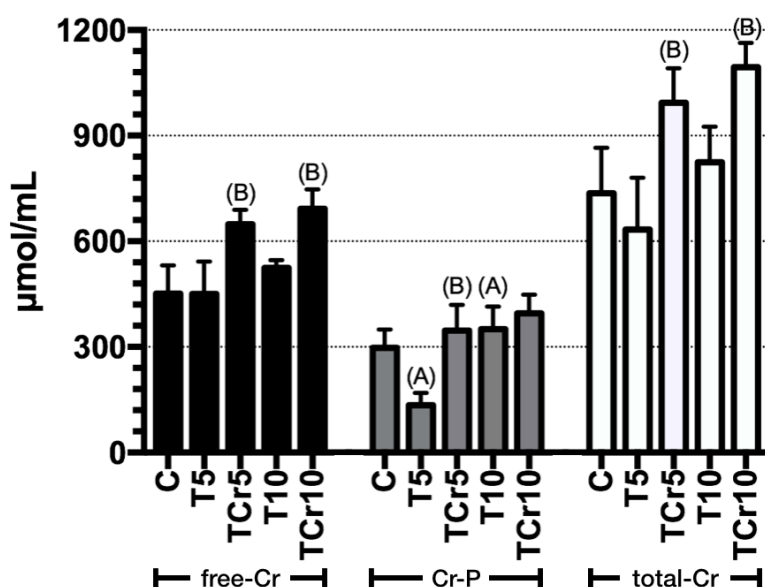
47 **Table 1.** Parameters of body weight, heart and tumor during progression of cancer-
48 induced cachexia, with or without creatine supplementation.

	C	T5	TCr5	T10	TCr10
Δ Body weight excluding tumor (g) (n = 20)	30 ± 16	-15.2 ± 4.7 ^(A)	12.2 ± 6.4 ^(B)	-23.9 ± 8.5 ^(A)	12.4 ± 5.8 ^(B)
Tumor weight (g) (n = 20)	-	3.9 ± 0.9	3.6 ± 1.2	10.9 ± 2.1	8.5 ± 1.6

Heart

Total weight (mg) (n = 12)	714 [687 - 729]	793 [685 - 818]	730 [707 - 768]	825 [705 - 843]	711 [634 - 785]
Left ventricle (mg) (n = 12)	362 [356 - 378]	454 [416 - 465] ^(A)	383 [364 - 397] ^(B)	488 [442 - 498] ^(A)	391 [342 - 424] ^(B)
Right ventricle (mg) (n = 12)	106 [103 - 108]	78 [76 - 84] ^(A)	88 [84 - 93] ^(B)	73 [69 - 77] ^(A)	89 [80 - 95] ^(B)
Left atrium (mg) (n = 12)	163 [155 - 174]	163 [150 - 183]	164 [149 - 168]	165 [159 - 178]	122 ^(B) [109 - 139]
Right atrium (mg) (n = 12)	82 [71 - 88]	94 ^(A) [91 - 97]	87 [80 - 92]	87 [82 - 94]	82 [78 - 84]
Ventricles morphometry					
Left (μm) (n = 8)	1115 \pm 27	1195 \pm 15 ^(A)	1123 \pm 19 ^(B)	1009 \pm 15 ^(A)	1076 \pm 08 ^(B)
Right (μm) (n = 8)	703 \pm 32	531 \pm 21 ^(A)	679 \pm 12 ^(B)	328 \pm 14 ^(A)	656 \pm 28 ^(A)

1 Groups represent number of days after subcutaneous injection of 8.0×10^7 tumor cells with or
 2 without creatine supplementation. C – Control group; T5 – Rats injected with tumor cells and
 3 evaluated after 5 days; TCr5 – Rats injected with tumor cells, supplemented with creatine (8
 4 g/L) and evaluated after 5 days; T10 – Rats injected with tumor cells and evaluated after 10
 5 days; TCr10 – Rats injected with tumor cells, supplemented with creatine (8 g/L) and
 6 evaluated after 10 days. Controls received an injection of 0.5 mL phosphate-buffered saline.
 7 Data are shown as mean \pm SD when parametric, and as median [25th – 75th percentils] when
 8 nonparametric. (A) $p < 0.05$ when compared to control; (B) $p < 0.05$ when compared to tumor
 9 group; as evaluated by One-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc test when
 10 parametric, and by Kruskal-Wallis followed by Dunn's post hoc test when nonparametric. All
 11 groups were tested for normal distribution by Shapiro-Wilk normality test, and outlier
 12 detection by ROUT test. Δ – (final – initial); n – number of animals evaluated.
 13
 14
 15



16
 17 **Figure 1.** Creatine supplementation increases free creatine and creatine-phosphate content
 18 in heart tissue of tumor-bearing animals. Groups represent number of days after
 19 subcutaneous injection of 8.0×10^7 tumor cells with or without 8g/L of creatine
 20 supplementation, *ad libitum* in drinking water, starting from the day after tumor inoculation
 21 and lasting all experimental period. Free-Cr- Free creatine; Cr-P – Creatine phosphate;
 22 Total-Cr – Total creatine. C – Control group; T5 – Rats injected with tumor cells and
 23 evaluated after 5 days; TC5 – Rats injected with tumor cells, supplemented with creatine and

1 evaluated after 5 days; T10 – Rats injected with tumor cells and evaluated after 10 days;
2 TC105 – Rats injected with tumor cells, supplemented with creatine and evaluated after 10
3 days. Data are shown as mean \pm SD. (A) $p < 0.05$ when compared to control group; (B)
4 $p < 0.05$ when compared to tumor group; as evaluated by One-way ANOVA followed by
5 Bonferroni post hoc test. $n = 12/\text{group}$.
6

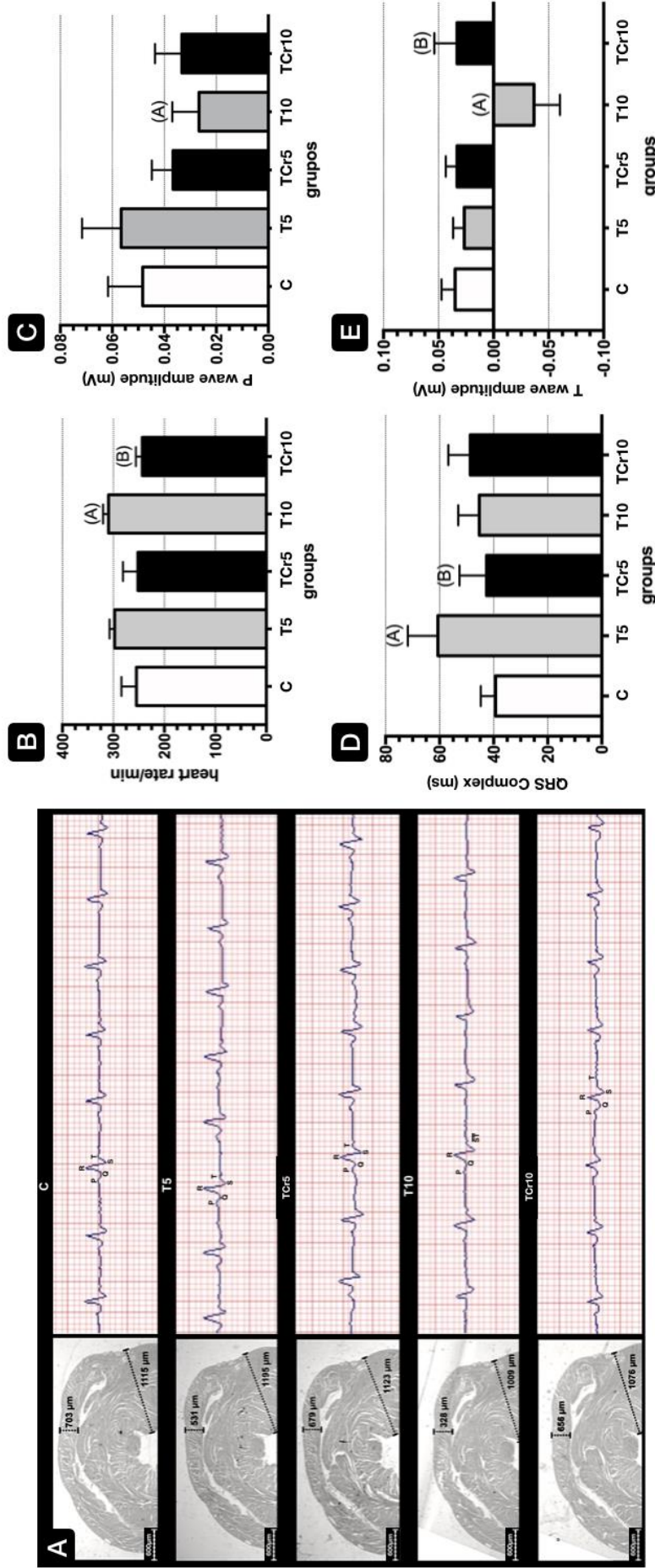


Figure 2. Creatine supplementation decreases heart rate and increase effectiveness of ventricle repolarization, 10 days after tumor inoculation. (A) representative histological images from morphometric analysis of the ventricles and electrocardiography traces from different experimental groups. (B) Heart rate in beats per minute (bpm). (C) quantitative analysis of atrial depolarization, represented by P wave amplitude, in mV. (D) quantitative analysis of ventricular depolarization, represented by time to QRS trace execution, in ms. (E) quantitative analysis of ventricle repolarization, represented by T wave amplitude, in mV. Data are shown as mean \pm SD. (A) $p < 0.05$ when compared to control; (B) $p < 0.05$ when compared to tumor group; as evaluated by One-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc test when parametric, and by Kruskal-Wallis followed by Dunn's post hoc test when nonparametric. All groups were tested for normal distribution by Kruskal-Wallis normality test, and outlier detection by ROUT test. $n = 8$ animals/group.

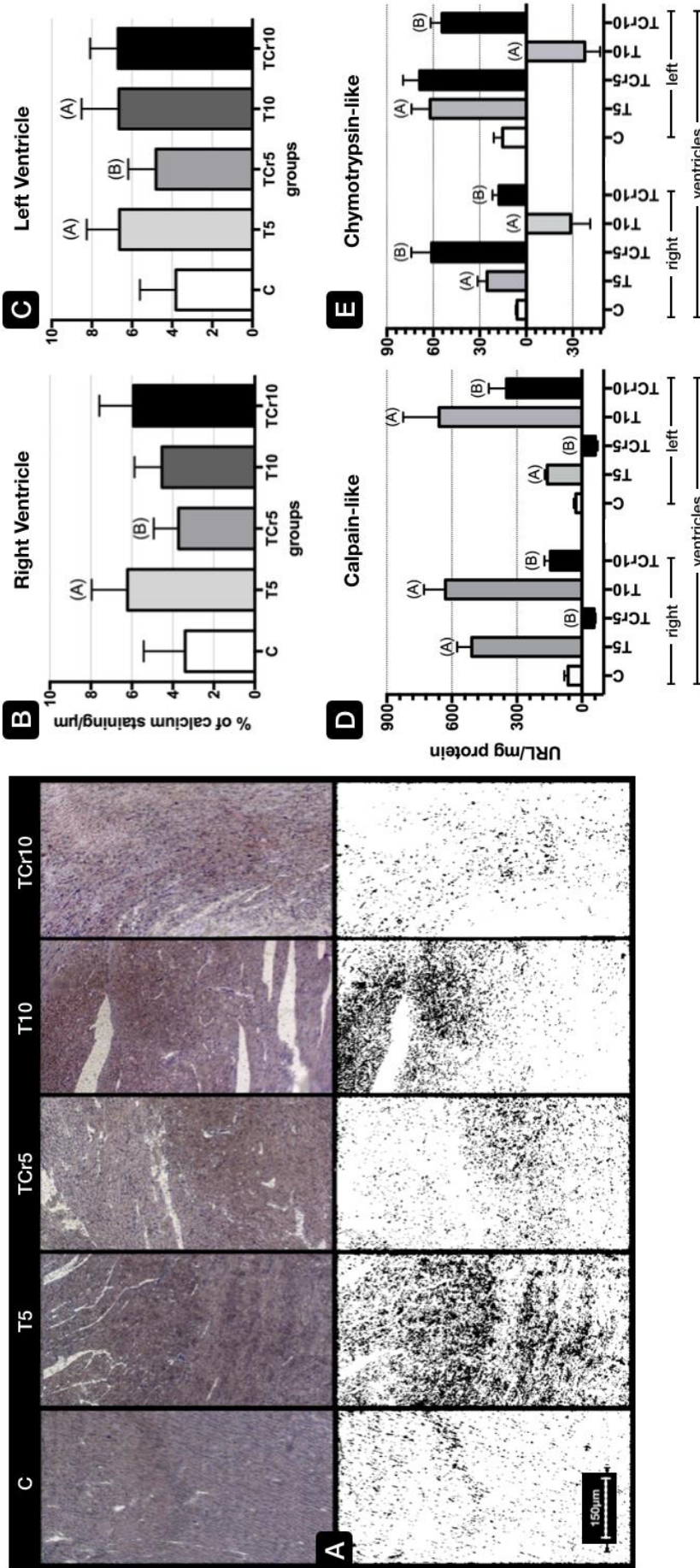
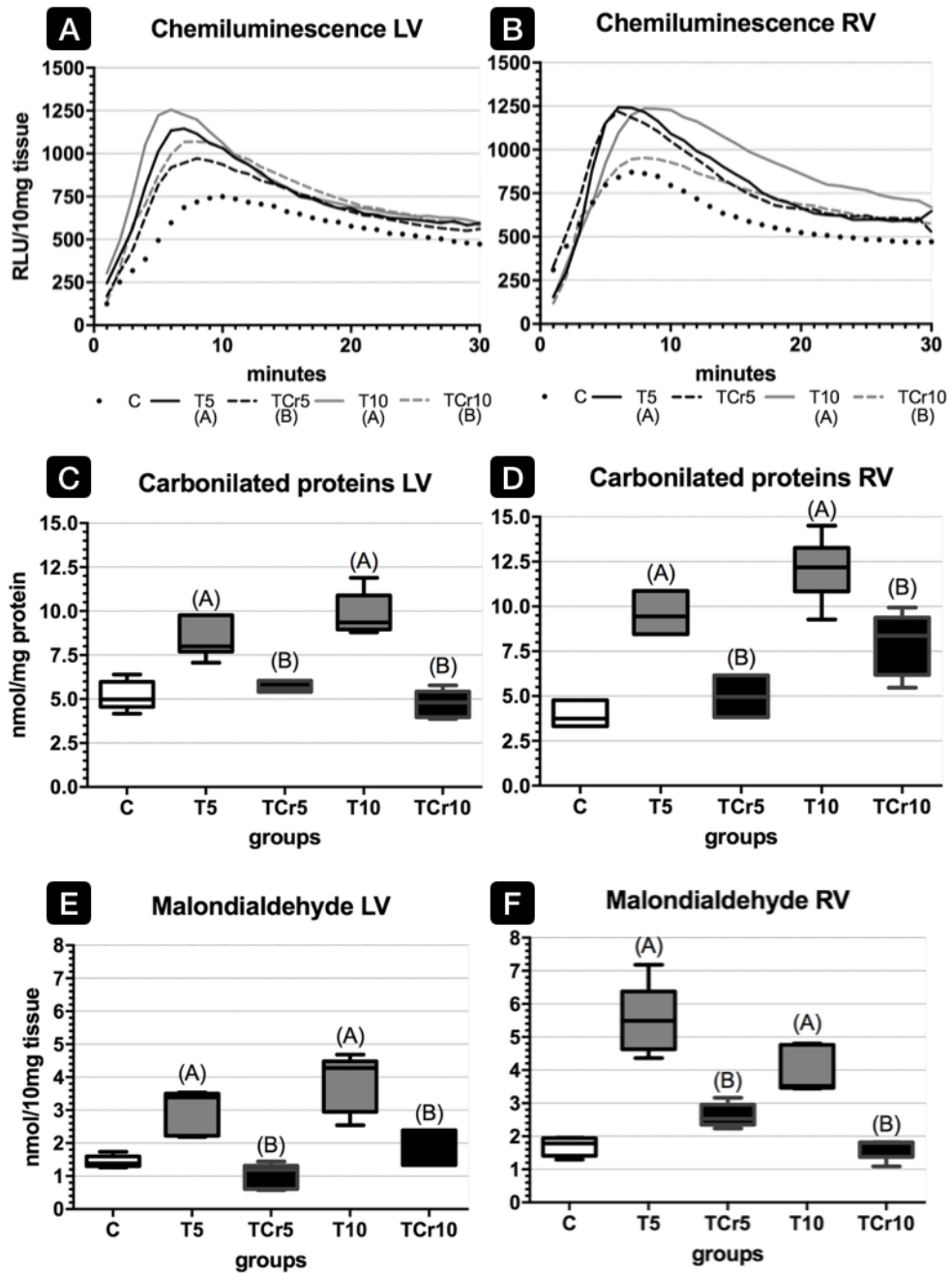


Figure 3. Myoplasmic calcium content and proteolytic status are differentially affected by creatine supplementation in the time course of heart loss during cachexia development. (A) representative histological images from von kossa staining at right ventricle, from different experimental groups. On the top, hematoxylin & eosin, added by von kossa staining. In both, 200x magnification. On the bottom, the same images were inverted, reinforcing the presence of free calcium at myoplasm. (B-C) Quantitative analysis of von kossa staining at right and left ventricles, respectively. (D) calcium-dependent proteolytic activity represented by calpain-like activity, in right and left ventricles. (E) general proteolytic activity represented by chymotrypsin-like activity, in right and left ventricles. Data are shown as mean \pm SD when parametric, and as box plots (median [25th - 75th percentils]) when nonparametric. # $p < 0.05$ when compared to T5; † $p < 0.05$ when compared to TC5; ‡ $p < 0.05$ when compared to T10, as evaluated by One-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test when parametric, and by Kruskal-Wallis followed by Dunn's post hoc test when nonparametric. All groups were tested for normal distribution by Kormogorov-Smirnov normality test, and outlier detection by Grubb's test. $n = 8$ animals/group.

1



2
3 **Figure 4.** Oxidative stress respond differentially on the right and left ventricles, after creatine
4 supplementation. (A-B) Lipid peroxidation curves, evaluated by hydroperoxide-initiated
5 chemiluminescence on right and left ventricles, respectively. (C-D) Oxidative modifications to
6 proteins evaluated by carbonylation on right and left ventricles, respectively. (E-F) Oxidation
7 to lipids evaluated by thiobarbituric acid reactive substances on right and left ventricles,
8 respectively. (A-B) Mean curves were compared by two way ANOVA followed by
9 Bonferroni's post hoc test. (C-F) Data are shown as box plots (median [25th – 75th
10 percentils]) as they were detected as non parametric data, and compared by Kruskal-Wallis
11 followed by Dunn's post hoc test. In all cases, # $p < 0.05$ when compared to T5; † $p < 0.05$ when
12 compared to TC5; ‡ $p < 0.05$ when compared to T10. All groups were tested for normal
13 distribution by Kormogorov-Smirnov normality test, and outlier detection by Grubb's test. $n =$
14 8 animals/group.
15

- 1
- 2
- 3
- 4
- 5
- 6
- 7
- 8
- 9
- 10
- 11
- 12
- 13
- 14
- 15
- 16
- 17
- 18
- 19
- 20
- 21
- 22
- 23
- 24
- 25
- 26

ANEXO

1

ANEXO A

2

Aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais

Universidade
Estadual de Londrina

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 204/2014

Londrina, 18 de Dezembro de 2014

Prezado Pesquisador,

A CEUA/UEL reunida em 02 de Dezembro de 2014 avaliou o projeto de pesquisa intitulado "Efeito da suplementação de creatina sobre a modulação da caquexia cardíaca e parâmetro de estresse oxidativo em ratos Wistar portadores de tumor Walker-256", registrado sob o processo CEUA nº25894.2014.58, pesquisa do Centro de Ciências Biológicas, desenvolvido sob sua responsabilidade, julgando-o **aprovado** para execução entendendo-se que os princípios éticos postulados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal estão respeitados.

Serão utilizados 160 ratos Wistar machos, de 200 a 250 g e provenientes do Biotério Central da UEL. O projeto tem como objetivo avaliar o efeito da suplementação de creatina sobre a caquexia cardíaca e corporal induzida pelo tumor Walker-256 em ratos Wistar machos em diferentes tempos experimentais. Para tanto, os animais serão divididos em 8 grupos: controle 5 dias (C5), controle/creatina 5 dias (CC5), tumor 5 dias (T5), tumor/creatina 5 dias (TC5), controle 10 dias (C10), controle creatina 10 dias (CC10), tumor 10 dias (T10) e tumor/creatina 10 dias (TC10). Nos grupos com tumor (T5, TC5, T10 e TC10) será implantada solução de $8,0 \times 10^7$ células viáveis em PBS via subcutânea e, para indução do tumor sólido durante a fase experimental, as mesmas células serão inoculadas e retiradas das passagens intraperitoneais e injetadas intramuscularmente no flanco direito dos animais que terão seus tumores dissecados cuidadosamente para pesagem e realização do cálculo da perda de massa do músculo esquelético. Será ofertada creatina diluída (8g) para os animais dos grupos com creatina (CC5 e TC10). Os animais serão submetidos à anestesia com ketamina/xilazina (100/160 mg/kg), sofrerão abertura da cavidade abdominal e ruptura do músculo gastrocnêmio no momento da eutanásia aonde será retirado o coração e dividido em direito e esquerdo, pesado, aliqüotado e estocado em nitrogênio líquido. Os protocolos experimentais estão aprovados para execução em 8 meses.

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

Waldiceu Ap. Verri Junior

Prof. Dr. Waldiceu Aparecido Verri Junior
Coordenador da CEUA/UEL

Ilmo. Sr.

Prof. Dr. Rubens Cecchini

Coordenador do Projeto

Departamento de Patologia

Centro de Ciências Biológicas

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 Ciências Biológicas.

3