



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

PAOLA SANCHES CELLA

**SUPLEMENTAÇÃO DE CREATINA PREVINE A ATROFIA
MUSCULAR PELA ATENUAÇÃO DA INFLAMAÇÃO
SISTÊMICA E DA SINALIZAÇÃO PARA DEGRADAÇÃO
PROTEICA EM RATOS COM TUMOR DE WALKER-256**

Londrina
2018

PAOLA SANCHES CELLA

**SUPLEMENTAÇÃO DE CREATINA PREVINE A ATROFIA
MUSCULAR PELA ATENUAÇÃO DA INFLAMAÇÃO
SISTÊMICA E DA SINALIZAÇÃO PARA DEGRADAÇÃO
PROTEICA EM RATOS COM TUMOR DE WALKER-256**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação associado em Educação Física – UEL/UEM, na área de concentração de Fisiologia do Exercício, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Educação Física.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Deminice

Londrina
2018

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

Cella, Paola Sanches .

Suplementação de creatina previne a atrofia muscular pela atenuação da inflamação sistêmica e da sinalização para degradação proteica em ratos com tumor de Walker-256 / Paola Sanches Cella. - Londrina, 2018.

45 f. : il.

Orientador: Rafael Deminice.

Coorientador: Poliana Camila Marinello.

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

Inclui bibliografia.

1. Proteólise Muscular - Tese. 2. Creatina - Tese. 3. Tumor - Tese. I. Deminice, Rafael . II. Marinello, Poliana Camila . III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Educação Física e Esportes. Programa de Pós-Graduação em Educação Física. IV. Título.

PAOLA SANCHES CELLA

**SUPLEMENTAÇÃO DE CREATINA PREVINE A ATROFIA
MUSCULAR PELA ATENUAÇÃO DA INFLAMAÇÃO SISTÊMICA E
DA SINALIZAÇÃO PARA DEGRADAÇÃO PROTEICA EM RATOS
COM TUMOR DE WALKER-256**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação associado em Educação Física – UEL/UEM, na área de concentração de Fisiologia do Exercício, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Educação Física.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rafael Deminice
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Waldiceu Aparecido Verri Júnior
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Sidney Barnabé Peres
Universidade Estadual de Maringá - UEM

Londrina, 14 de junho de 2018.

AGRADECIMENTO AO ÓRGÃO DE FOMENTO

Ao apoio financeiro da Capes pela bolsa de estudos concedida.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, irmão e avós pelo amor, incentivo e apoio.

Aos amigos, que sempre incentivaram meus sonhos e estiveram sempre ao meu lado.

Ao Prof. Rafael Deminice que me acompanhou, transmitindo-me tranquilidade e a todos colegas do laboratório de bioquímica.

CELLA, Paola Sanches. **Suplementação de creatina previne a atrofia muscular pela atenuação da inflamação sistêmica e da sinalização para degradação proteica em ratos com tumor de walker-256**. 2018. 45f. Dissertação de Mestrado. Programa Associado UEL/UEM de Pós-graduação em Educação Física. Centro de Educação Física e Esporte (CEFE). Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

RESUMO

INTRODUÇÃO: Estudos recentes demonstram que a suplementação de creatina pode inibir a perda de peso induzida por distrofia de Duchenne, miastenia grave, esclerose lateral amiotrófica e imobilizações. No entanto, poucos trabalhos investigam o papel da suplementação com creatina na perda de massa muscular induzida pela caquexia do câncer. **OBJETIVO:** Analisar o efeito da suplementação de creatina na caquexia induzida pela forma sólida do tumor de Walker- 256. **MÉTODOS:** Ratos Wistar machos (n=24) foram pesados e divididos aleatoriamente em três grupos (n=8): controle (C), inoculados com tumor (T), e inoculados com tumor e suplementados com creatina (TCr). A creatina foi adicionada na água de beber (8g/L) por um período de 21 dias, *ad libitum*. Após 11 dias de suplementação, células tumorais foram inoculadas subcutâneamente nos grupos T e TCr. Dez dias após a implantação tumoral os animais foram pesados e eutanasiados. O sangue foi coletado e os músculos gastrocnêmio e sóleo e EDL assim como o tumor foram retirados e pesados para análises bioquímicas e histológicas. **RESULTADOS:** O crescimento tumoral promoveu redução no ganho de peso corporal (-21%), atrofia no músculo sóleo (área de secção transversa -ASTr: 31%) e EDL (ASTr: 7,13%) todos comparados com o grupo C (p<0,05). Além disso, promoveu inflamação sistêmica caracterizada pelo aumento da contagem de leucócitos (115%) e de citocinas circulantes (IL-6, 347% e TNF- α , 166%), assim como aumento da massa do baço (80%), da polpa branca (49%) e do folículo linfoide (120%) (p<0,05). No músculo EDL, os níveis de Murf-1 e Atrogin-1 aumentaram, respectivamente, 27% e 23% em relação ao grupo C, porém não houve alteração na expressão de mRNA da atrogin-1. Em contrapartida, a suplementação de creatina preveniu a perda de massa corporal, reduziu o tamanho do tumor (46%), amenizou a atrofia do músculo sóleo (ASTr, 15,8%) restaurou os níveis plasmáticos das citocinas inflamatórias a níveis basais (C=TCr,) assim como foi capaz de reduzir o tamanho da polpa branca (63%) e do folículo linfoide (61%) do baço (p<0,05). Além de reduzir os níveis basais de mRNA de atrogin-1 e das proteínas Murf-1 e Atrogin-1. Embora a suplementação de creatina tenha reduzido o crescimento tumoral, ela não alterou a proliferação celular, apoptose e deposição de tecido conjuntivo no tumor. **CONCLUSÃO:** A suplementação de creatina previne o desenvolvimento da caquexia do câncer, reduzindo a atrofia muscular e atenuando o ambiente pró-inflamatório induzido pelo tumor, condição essa responsável por diminuir a expressão de importantes reguladores da degradação de proteínas mediada pelo sistema UP. Apesar da significativa redução no tamanho do tumor, a suplementação de creatina não mitigou a agressividade tumoral.

Palavras-chave: Proteólise muscular. Creatina. Tumor.

CELLA, Paola Sanches. **Creatine supplementation prevents muscle atrophy by attenuating systemic inflammation and protein degradation signaling in walker-256 tumor-bearing rats**. 2018. 45p. Dissertation (Master's degree in Physical Education). Centro de Educação Física e Esporte (CEFE). Universidade Estadual de Londrina, Londrina/PR, 2018.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Evidence demonstrated that creatine supplementation inhibits weight loss induced by Duchenne dystrophy, myasthenia gravis and immobilization. However, few studies investigated the role of creatine supplementation in the loss of muscle mass induced by cachexia of cancer. **OBJECTIVE:** To investigate the effect of creatine supplementation on cachexia induced by the solid form of Walker-256 tumor. **METHODS:** Male Wistar rats were weighed and randomly assigned into four groups (n = 8) designated as control (C), tumor-bearing (T), and tumor-bearing supplemented with creatine (TCr). Creatine was offered in drinking water for 21 days (8 g/L) *ad libitum*. After 11 days of supplementation, tumour cells were implanted subcutaneously into T and TCr groups. Ten days after tumour implantation, the animals were weighed and euthanized. Blood was collected and the gastrocnemius, soleus and EDL muscles, as well as the tumor, were removed and weighed for biochemical and histological analyzes. **RESULTS:** Tumor growth promoted loss of body mass (-21.3%), reduced cross-sectional area (ASTr) in soleus (34.37%) and EDL (7.13%) all compared to C group (p<0,05). In addition, it promoted systemic inflammation characterized by increased leukocyte counts (115%) and circulating cytokines (TNF- α , 166% and IL-6, 347,4%), as well as increased spleen mass (80%), white pulp (49%) and lymphoid follicle (120%) (p<0.05). In the EDL muscle, the protein levels of Murf-1 and Atrogin-1 increased, respectively, 27% and 23% in relation to group C, but there was no change in atrogin-1 mRNA expression. On the other hand, supplementation reversed body weight loss, reduced tumor size (46%), improved atrophy of soleus muscle (ASTr, 15.8%) restored plasma levels of inflammatory cytokines to basal levels (C=TCr), as well as reducing the size of the white pulp (63%) and the lymphoid follicle (61%) of the spleen (p<0.05). In addition, it reduced basal levels of ATROGIN-1 mRNA and protein levels of Murf-1 and Atrogin-1. Although creatine supplementation reduced tumor growth, it did not alter cell proliferation, apoptosis and connective tissue deposition. **CONCLUSION:** In conclusion, creatine supplementation prevents cancer-cachexia development and skeletal muscle wasting by attenuating the tumor-induced pro-inflammatory environment, a condition that is responsible for decreasing the expression of important regulators of protein degradation mediated by ubiquitin proteasome system. Despite the significant reduction in tumor size, creatine supplementation did not mitigate tumor aggressiveness.

Key Words: Muscle proteolysis. Creatine. Cachexia

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Delineamento do estudo.....	23
Figura 2 -	Avaliação dos parâmetros gerais dos animais	28
Figura 3 -	Áreas de secção transversa (ASTr) marcada com H&E do músculo sóleo e EDL.....	29
Figura 4 -	Análises do estresse oxidativo muscular e inflamação.	30
Figura 5 -	Análise da síntese e da degradação de proteínas no músculo esquelético.....	31
Figura 6 -	Análises tumorais.....	32
Figura 7 -	Resumo Ilustrativo dos efeitos da suplementação de creatina na sinalização para proteólise muscular esquelética em ratos portadores de tumor de Walker-256	33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP	Adenosina difosfato
ATP	<i>Adenosina trifosfato</i>
ASTr	Área de secção transversa do músculo
Cr	Creatina
CK	Creatina quinase
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDL	Extensor longo dos dedos
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FAD	Flavina-adenina- dinucleotídeo
FBXO	F-box protein 32
GAPDH	Gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase
GSH	Glutathiona reduzida
GSSG	Glutathiona oxidada
IκB	Fator de inibição kappa B
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IGF-1	Fator de crescimento insulínico- 1
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MDA	Malondialdeído
MtCK	Mitocondrial CK
mtDNA	DNA mitocondrial
NAD	Nicotinamida- adenina- dinucleotídeo
NFκB	Fator nuclear kappa B
PCr	Fosfocreatina
PCK	Fosfocreatina quinase
RL	Radicais livres
RNA	Ácido ribonucleico
TA	Tibial anterior
TNF-α	Fator de necrose tumoral- alfa
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling
Ub	Ubiquitina

UP	Ubiquitina proteassoma
MuRF1	<i>Muscle RING finger protein 1</i>
SCWD	Sociedade de sarcopenia,caquexia e desordens de perda, do inglês <i>Society on Sarcopenia, Cachexia & Wasting Disorders</i>
SOD 1	Sociedade de sarcopenia,caquexia e desordens de perda, do inglês <i>Society on Sarcopenia, Cachexia & Wasting Disorders</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
	OBJETIVOS	13
1.1	Objetivo Geral.....	13
1.2	Objetivos específicos	13
2	HIPÓTESES (H).....	14
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	15
3.1	Caquexia	15
3.2	Estresse oxidativo, proteólise e inflamação no músculo esquelético	16
3.3	Suplementação de creatina nas doenças relacionadas ao músculo esquelético.....	19
4	MÉTODOS	23
4.1	Animais e tratamento	23
4.2	Delineamento experimental	23
4.3	Implantação do tumor	24
4.4	Eutanásia e preparação do Tecido.....	24
4.5	Análise Histológica.....	24
4.6	Estresse oxidativo muscular, citocinas plasmáticas e contagem total de leucócitos	25
4.7	Biologia Molecular	26
4.8	Análises estatísticas	27
5	RESULTADOS.....	28
6	DISCUSSÃO	34
7	CONCLUSÃO	37
	ANEXO A - Comissão de ética no uso de animais	46

1 INTRODUÇÃO

A perda de massa muscular é o principal componente da caquexia do câncer, a qual prejudica progressivamente a capacidade funcional dos pacientes (TAN; FEARON, 2008). Essa desordem compromete a eficácia do tratamento terapêutico e aproxima os pacientes com câncer de um prognóstico irreversível (GALVÃO *et al.*, 2010).

Atualmente, a perda muscular causada pela caquexia é usada como prognóstico de sobrevida (ARGILÉS; BUSQUETS; STEMMLER; LÓPEZ-SORIANO, 2014; GALVÃO *et al.*, 2008; LENK; SCHULER, ADAMS, 2010). Estudos sugerem que a perda de massa muscular induzida pela caquexia do câncer é resultado do desequilíbrio entre a degradação e a síntese proteica, mediada, entre outros fatores, por citocinas inflamatórias e espécies reativas de oxigênio (ERO) (BALKWILL e MANTOVANI, 2012; PENNA *et al.*, 2010; POWERS *et al.*, 2016). O aumento do estresse oxidativo local e a regulação das citocinas pró-inflamatórias podem promover o catabolismo muscular pelo sistema ubiquitina- proteassoma (UP). A proteólise através do sistema dependente de Ub (ubiquitina) é o principal mecanismo para aumentar a degradação muscular na caquexia do câncer (BALKWILL e MANTOVANI, 2012). A atrofia muscular está relacionada com duas principais E3 ligases do sistema da UP as quais são específicas do músculo esquelético, sendo estas a atrogin-1, também conhecida como *muscle atrophy F-Box* (Mafbx), e a *muscle ring-finger-1* (Murf-1). Essas E3 ligases específicas são as responsáveis por direcionarem a poliubiquitinação das proteínas marcadas diretamente para a proteólise no sistema Ub (GALVÃO *et al.*, 2008); a atividade do sistema Ub se encontra aumentada no músculo esquelético com atrofia por diferentes causas, incluindo pela caquexia do câncer (POWERS; MORTON; AHN; SMUDER, 2015).

A suplementação de creatina é muito utilizada no âmbito esportivo com o objetivo de aumentar a concentração de creatina nas células musculares permitindo aos atletas aumentarem a capacidade de disponibilidade de ATP. Após adquirir notabilidade nos anos 90 na área esportiva, a suplementação de creatina foi introduzida na área médica devido aos efeitos terapêuticos e profiláticos encontrados em doenças que envolvem a perda de massa muscular como a síndrome de Duchenne, esclerose lateral amiotrófica, atrofia por desuso, entre outras (GUALANO *et al.*, 2010; GUALANO *et al.*, 2012; JOHNSTON *et al.*, 2009; MAZZINI *et al.*, 2001; MENEZES *et al.*, 2007; SAKKAS, SCHAMBELAN; MULLIGAN, 2009; SMITH; AGHARKAR; GONZALES, 2014; TARNOPOLSKY *et al.*, 2004).

Os principais mecanismos descritos para ação da creatina nessas doenças baseiam-se em sua interação com a bioenergética celular (sistema creatina fosfato), devido a capacidade

de aumentar o ATP nas mitocôndrias e na regulação energética (o efeito pleiotrópico da suplementação de creatina é revisado por Walliman *et al.*, 2011, enquanto que o papel da terapêutico da creatina é revisada por Gualano *et al.*, 2010 e Gualano *et al.*, 2011).

Recentemente, a suplementação de creatina demonstrou ter propriedades antioxidantes diretas e indiretas além de ser eficaz na redução da concentração de citocinas inflamatórias (BASSIT; CURI; COSTA ROSA, 2008; CAMPOS-FERRAZ *et al.*, 2016; FIMOIGNARI *et al.*, 2009; MENEZES *et al.*, 2005; TARNOPOLSKY *et al.*, 2004; WALLIMANN; TOKARSKA-SCHLATTNER; SCHLATTNER, 2011). Apesar dos resultados promissores, até o momento apenas dois trabalhos analisaram os efeitos da suplementação de creatina na caquexia do câncer. Deminice *et al.*, 2016 e Campos-Ferraz *et al.*, 2016 demonstraram que a suplementação de creatina pode prevenir a perda de peso corporal, o crescimento do tumor e apresenta efeito anti-inflamatório em ratos portadores de tumor. Entretanto, os efeitos da suplementação de creatina sobre a atrofia muscular induzida pela caquexia, seus mecanismos de ação e a ação da suplementação de creatina no tumor permanecem desconhecidos.

OBJETIVOS

1.1 Objetivo Geral

Investigar os efeitos da suplementação de creatina sobre a perda de massa muscular em ratos inoculados com células tumorais de Walker-256.

1.2 Objetivos específicos

- Estudar os efeitos do crescimento do tumor de Walker-256 sobre o desenvolvimento da caquexia.
- Analisar o efeito da suplementação de creatina sobre o crescimento do tumor, perda de massa corporal e área de secção transversa muscular.
- Investigar os possíveis mecanismos pelos quais a suplementação com creatina pode amenizar/reverter a caquexia, analisando principalmente a inflamação e o sistema Ub.
- Estudar os efeitos da suplementação de creatina sobre o tamanho e parâmetros de agressividade tumoral.

2 HIPÓTESES (H)

Hipótese alternativa (H_1) = A suplementação de creatina previne/ameniza a perda de massa corporal e massa muscular através da diminuição do estresse oxidativo e inflamação e diminui a sinalização de enzimas de degradação proteica induzidas pelo tumor de Walker-256 em ratos.

Hipótese nula (H_0) = A suplementação de creatina não altera as complicações, tais como perda de massa corporal, estresse oxidativo, inflamação, e não modifica a expressão gênica de enzimas que aumentam a síntese e diminuem a degradação proteica provocada pelo tumor de Walker-256 em ratos.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Caquexia

A caquexia é uma síndrome complexa caracterizada pela perda involuntária e contínua de massa muscular esquelética (com ou sem detrimento do tecido adiposo), não pode ser totalmente revertida com auxílio nutricional e conduz a um comprometimento funcional progressivo (FEARON *et al.*, 2011) Tal síndrome não está somente relacionada com doenças crônicas (comumente descrita associada ao câncer), estando presente em outras condições inflamatórias como doença pulmonar obstrutiva crônica, insuficiência cardíaca, doença renal crônica e sepse (BOWEN; SCHULER; ADAMS, 2015; EVANS *et al.*, 2008). A caquexia é também frequentemente acompanhada de anorexia, o que pode agravar a perda de massa corporal promovida pela doença.

A incidência da síndrome entre pacientes com câncer é muito alta e varia de acordo com o tipo do tumor. Pacientes com câncer gástrico ou pancreático têm uma incidência maior que 80%, câncer de pulmão, próstata ou cólon ficam próximos de 50% e em tumores mamários ou algumas leucemias, cerca de 40% dos pacientes desenvolvem a síndrome (ARGILÉS *et al.*, 2014). O tempo de sobrevida está principalmente relacionado com a perda de massa muscular, sendo um importante fator de prognóstico e aparenta ser independente da perda de peso corporal (ARGILÉS *et al.*, 2014).

A caquexia, independente da causa, frequentemente está associada com a sarcopenia, primeiramente caracterizada pela perda lenta e progressiva de massa muscular associada ao envelhecimento na ausência de qualquer doença ou condição subjacente (BOWEN; SCHULER; ADAMS, 2015; KIM; CHOI, 2013). A SCWD - *Society on Sarcopenia, Cachexia & Wasting Disorders*- determina que o elemento chave da sarcopenia é a perda de força muscular ao invés da perda de massa. Em suma, a caquexia pode induzir sarcopenia sendo esta um dos principais fatores responsáveis por diminuir a qualidade de vida dos pacientes (ROLLAND *et al.*, 2011).

Argilés, *et al.* (2014) caracterizam a caquexia como um conjunto de desordens metabólicas onde ocorre desbalanço entre a síntese e degradação proteica, e diminuição da capacidade oxidativa mitocondrial, prejudicando a produção de ATP pela célula (ARGILÉS *et al.*, 2014; TAYEK *et al.*, 1986). O aumento do gasto energético de repouso é devido, principalmente, a ação de fatores circulantes (citocinas pró inflamatórias) produzidos pelo sistema imune em resposta ao tumor ou até mesmo produzidas pelo próprio tumor, como o fator indutor de proteólise e o fator de mobilização de lipídios (EVANS *et al.*, 2008; MANTOVANI; MADEDDU; MACCIÒ, 2012). Os efeitos catabólicos das citocinas

envolvidas promovem progressivas alterações atroficas no músculo esquelético em doenças crônicas (TISDALE, 2010).

O crescimento tumoral não interfere apenas no metabolismo proteico, o tumor promove também um aumento no catabolismo de carboidratos e lipídios o que potencializa o déficit calórico induzido pela anorexia (LAVIANO *et al.*, 2005; LAVIANO *et al.*, 2007). Assim, com o catabolismo dos substratos aumentado os pacientes passam a ter fraqueza e piora do quadro clínico (ARGILÉS *et al.*, 2014; COSTELLI; BACCINO, 2003).

3.2 Estresse oxidativo, proteólise e inflamação no músculo esquelético

O estresse oxidativo é caracterizado pela perda da homeostase desencadeada pelo desbalanço entre o sistema de defesa antioxidante e uma exacerbada produção de ERO (espécies reativas de oxigênio). As ERO são moléculas altamente instáveis cuja produção ocorre fisiologicamente devido aos produtos do metabolismo energético do oxigênio. A exacerbção das ERO pode ser tóxica para o organismo.

Para evitar uma superprodução de ERO e permitir que a célula continue em homeostase, o organismo conta com um sistema antioxidante complexo, os quais podem ser de origem endógena ou exógena. Os endógenos são classificados em a) enzimáticos os quais incluem a glutathione peroxidase, catalase e superóxido dismutase e b) os não enzimáticos que são a glutathione, peptídeos de histidina, transferrina e ferritina de ligação ao ferro, ácido lipóico, coenzima Q10, melatonina, uratos e tióis (MACCIÒ *et al.*, 2009; MANTOVANI *et al.*, 2003; MANTOVANI; MADEDDU; MACCIÒ, 2012).

Caso ocorra um desequilíbrio entre a concentração de ERO e antioxidantes, não permitindo que os antioxidantes neutralizem o excesso de ERO, isto afetará componentes celulares, principalmente os ácidos graxos poli-insaturados (lipoperoxidação), proteínas e especialmente o DNA (MACCIÒ *et al.*, 2009; MANTOVANI *et al.*, 2003; MANTOVANI *et al.*, 2007; MANTOVANI; MADEDDU; MACCIÒ, 2012). Se o equilíbrio não for reestabelecido poderá ocorrer disfunções celulares, morte celular e degeneração do tecido (RANDO, 2002).

As condições patológicas comumente relacionam-se com a superprodução de ERO (RANDO, 2002). Em pacientes com câncer, por exemplo, o estresse oxidativo parece aumentar a progressão da doença por mecanismos ainda não bem estabelecidos, entretanto o que se sabe é que existe relação entre o estresse e as alterações metabólicas, o qual influencia no funcionamento e eficácia do sistema imunológico e afeta a disponibilidade de compostos redutores (por exemplo NAD, FAD e GSH) (MACCIÒ *et al.*, 2009; MANTOVANI *et al.*,

1998; MANTOVANI; MADEDDU; MACCIÒ, 2012).

Em doenças que envolvem a perda de massa muscular o estresse oxidativo contribui para a ativação de vias de sinalização celular, através do aumento da expressão de componentes do sistema UP ou sistema proteassomal. Esse sistema proteolítico é o mais ativo na caquexia e atrofia muscular induzida pelo câncer e está relacionado com a progressão da caquexia (COSTELLI; BACCINO, 2003; GOMES-MARCONDES; TISDALE, 2002; PATEL; PATEL, 2017; TISDALE, 2009)

A atividade do UP depende da homeostase da célula, o desequilíbrio causado pelas ERO aumenta a atividade do sistema até que seja possível retomar a homeostase (SHANG; TAYLOR, 2011). Isso acontece porque as proteínas oxidadas aumentam a ativação da Ub, permitindo que a Ub se ligue às proteínas danificadas promovendo a degradação destas pelo sistema. Isso acontece pois é uma tentativa do organismo para se proteger da citotoxicidade induzida por essas proteínas oxidadas (AIKEN *et al.*, 2011; SHANG; TAYLOR, 2011).

A degradação pelo proteassoma pode ocorrer de forma dependente ou independente de ATP. No processo ATP dependente as proteínas precisam estar ubiquitinadas para serem reconhecidas e degradadas pelo complexo 26S (formado por um complexo 20S e dois 19S mais uma molécula de ATP). A Ub age em conjunto com três enzimas, sendo a E1 enzima ativadora, a qual faz a ligação da Ub com uma molécula de ATP, a E2 enzima de conjugação, responsável por transferir a Ub da E1 para a E2 e posteriormente auxiliar a E3 que é a proteína ligase que faz a marcação da proteína para que esta seja reconhecida e degradada pelo barril proteassomal (POWERS *et al.*, 2009). Porém algumas proteínas danificadas não precisam estar ubiquitinadas para serem reconhecidas pelo proteassoma, estas podem ser degradadas diretamente pelo complexo 20S, de forma independente de ATP (PETERS; FRANKE; KLEINSCHMIDT, 1994; SHANG; TAYLOR, 2011).

O estresse oxidativo exerce um papel fundamental na proteólise tanto na via dependente quanto independente de ATP. Na via independente, as ERO induzem modificações proteicas que levam ao reconhecimento destas pelo 20S. A via dependente de ATP possui a participação do fator de transcrição nuclear kappa B (NFκB). As ERO são capazes de inativar o fator inibitório kappa B (IκB) localizado no citoplasma, permitindo a translocação do NFκB para o núcleo, que promoverá o aumento da transcrição de genes que favorecem a proteólise, como E3 ligases, conhecidas também como atrogin-1 e MuRF1 (POWERS; SMUDER; JUDGE, 2012).

O NF-Kb é também um fator de transcrição muito importante na inflamação, pois induz a produção de citocinas pró-inflamatórias. Assim como o estresse oxidativo, a

inflamação também pode aumentar a atividade do sistema UP. As citocinas e as ERO parecem estar relacionadas e muitas vezes atuam em conjunto no sistema UP (GOODMAN, 1991; FLORES *et al.*, 1989; ZAMIR *et al.*, 1992; ZAMIR *et al.*, 1991). A inflamação está muito envolvida com a perda da massa muscular devido ao aumento da liberação de espécies reativas de oxigênio pelo sistema imune, favorecendo a ativação do NF- κ B (ARGILÉS *et al.*, 2014; GUARNIER *et al.*, 2010). A IL-1 e o TNF- α podem induzir a proteólise muscular pela mesma via que as ERO; a ativação do TNF- α aos receptores sarcolemáticos estimula a produção de ERO e promove a translocação do NF- κ B do citoplasma para o núcleo (LI; REID, 2000; SPATE; SCHULZE, 2004).

Resumindo, existem três principais mecanismos pelos quais a atividade aumentada do NF- κ B leva à atrofia do músculo: a) aumento da expressão de proteínas envolvidas na degradação proteica pelo sistema UP; b) aumento da expressão de citocinas inflamatórias; c) interferência na diferenciação miogênica (necessária para a regeneração de músculos atrofiados) (LI; MALHOTRA; KUMAR, 2008).

Muitos sistemas proteolíticos estão ativos na caquexia, como por exemplo, o sistema lisossomal, cálcio-dependente e o sistema da UP,mas os estudos mostram que o sistema predominante da caquexia do câncer é o UP em especial devido ao aumento de duas E3 ligases principais, a Murf-1 e a Atrogin-1(YUAN *et al.*, 2015). E esse aumento da atividade do sistema UP parece estar relacionando com o ambiente pró inflamatório e oxidante que o tumor promove (FEARON, GLASS e GUTTRIDGE, 2012; NERSALE; CARSON, 2014; YUAN *et al.*, 2015).

O TNF- α é responsável por vários distúrbios (apoptose, caquexia e resposta inflamatória) e está relacionado com a perda de peso e de apetite, aumento da termogênese, alterações no metabolismo dos carboidratos, proteínas e lipídios, resistência à insulina e indução de proteólise (PATEL; PATEL, 2017).

A função do TNF- α no metabolismo proteico ainda é controverso, estudos indicam que essa citocina não altera a síntese de proteínas e sim acelera a degradação, outros demonstram que reduz a síntese (CHARTER; GRIMBLE, 1989; LI *et al.*, 1998; LI; REID, 2000; SPATE; SCHULZE, 2004). Acredita-se que o TNF- α impeça a ocorrência do anabolismo pela inibição dos substratos de receptores de insulina promovendo aumento da resistência à insulina e impedindo sua ação anabólica (SPATE; SCHULZE, 2004). Com relação ao aumento da degradação proteica por TNF- α , o mecanismo mais relatado é através do sistema UP (SPATE; SCHULZE, 2004).

Com base no exposto, a busca de terapias não-farmacológicas tem sido realizada na

tentativa de amenizar as alterações musculares promovidas pelo câncer (LANDI *et al.*, 2007; LAVIANO *et al.*, 2007; RESZKA; WASOWICZ; GROMADZINSKA, 2006; WALLACE, 2005).

3.3 Suplementação de creatina nas doenças relacionadas ao músculo esquelético

A creatina (ácido α -metilguanidinoacético) é uma substância natural do organismo com duas formas de obtenção: endógena e exógena (carnes, ovos, peixes). Entretanto, apenas metade da necessidade corporal diária de creatina (~ 1 g/dia) é obtido na dieta, o restante é por meio da síntese endógena (BROSNAN; DA SILVA; BROSNAN, 2011; SMITH; AGHARKAR; GONZALES, 2014). Cerca de 95% da creatina do nosso organismo encontra-se nos músculos, os 5% restantes estão distribuídos entre o cérebro, fígado, testículos e rins (WALKER, 1979).

Existe uma capacidade máxima de síntese endógena de creatina. A ingestão de alimentos ricos em creatina aumenta seus níveis no organismo, sendo esse o objetivo da suplementação (SMITH; AGHARKAR; GONZALES, 2014; WYSS; KADDURAH-DAOUK, 2000). Entretanto, o transporte da creatina para dentro das células é limitado (160 mmol/kg), se os transportadores não estiverem funcionando ou se a concentração máxima de creatina for alcançada, os efeitos benéficos da creatina serão insignificantes (HARRIS; SODERLUND; HULTMAN, 1992; SMITH; AGHARKAR; GONZALES, 2014)

No organismo, a creatina pode ser encontrada na sua forma fosforilada (cerca de 60% das reservas energéticas) ou na sua forma livre (40%). Em questão de segundos a contração muscular utiliza toda a reserva de ATP (2-5 mM) da célula e então o sistema fosfocreatina (PCr) entra em ação, regenerando o ATP e facilitando a translocação de energia das mitocôndrias para os locais de elevada demanda energética (HARRIS; SODERLUND; HULTMAN, 1992; WALLIMANN *et al.*, 1992). A regeneração do ATP ocorre de forma rápida e reversível, o mecanismo envolve a transferência do grupo N-fosfilo para a fosforilcreatina para regenerar o ADP em ATP catalisada pela enzima fosforilcreatina quinase (PCK) (GUALANO *et al.*, 2010).

O interesse na creatina como suplemento cresceu com a descoberta da possibilidade de aumentar seu conteúdo intramuscular, de promover o ganho de força e de massa magra e não somente reter líquido. Então, a suplementação de creatina começou a ser estudada como um recurso ergogênico, primeiramente, no âmbito esportivo (para aumentar as reservas de PCr) promovendo aumento da fosforilação do ADP para ATP amenizando a depleção de energia

durante o movimento rápido do músculo (GUALANO *et al.*, 2010; GUALANO *et al.*, 2012; HARRIS; SODERLUND; HULTMAN, 1992; SMITH; AGHARKAR; GONZALES, 2014).

Além da relação com o metabolismo energético, a creatina está associada a alguns mecanismos de desregulação mitocondrial: exerce ação antioxidante, controla concentrações de cálcio intracelular, regula concentrações de glutamato extracelular e previne a abertura de poros de transição de permeabilidade mitocondrial (SMITH; AGHARKAR; GONZALES, 2014; STEFANI *et al.*, 2014; XU *et al.*, 1996). Assim, o interesse na suplementação de creatina em condições patológicas surgiu com sua aplicação em doenças neurodegenerativas que resultam ou progridem por mecanismos de insuficiência energética (SMITH; AGHARKAR; GONZALES, 2014; STEFANI *et al.*, 2014; XU *et al.*, 1996).

Em doenças onde ocorre perda de massa muscular como distrofia de Duchenne, esclerose lateral amiotrófica e fibromialgia, entre outras, os efeitos da suplementação de creatina vêm sendo estudados (CAMPOS-FERRAZ *et al.*, 2014; ALVES *et al.*, 2013; GUALANO *et al.*, 2010; JOHNSTON *et al.*, 2009; MAZZINI *et al.*, 2001; TARNOPOLSKY *et al.*, 2004). Nessas doenças a suplementação melhorou a composição corporal, preservou e até mesmo aumentou a força e atenuou a perda de massa muscular (ALVES *et al.*, 2013; CAMPOS-FERRAZ *et al.*, 2014; GUALANO *et al.*, 2010; JOHNSTON *et al.*, 2009; MAZZINI *et al.*, 2001; SAKKAS; SCHAMBELAN; MULLIGAN, 2009; TARNOPOLSKY *et al.*, 2004). Entretanto, os mecanismos de ação da creatina ainda não estão elucidados. Ao que parece, a suplementação exerce papel antioxidante e anti-inflamatório, mas não se sabe ao certo se essa resposta é decorrente de ação sistêmica ou muscular (BASSIT; CURI; ROSA, 2008).

Lawler *et al.* (2002) revelaram um potencial da creatina em agir de forma direta na remoção de ERO, outro estudo demonstrou que a creatina pode exercer atividade citoprotetora contra alguns agentes oxidativos. A citoproteção encontrada parece ser independente do estado antioxidante da célula (estado das enzimas antioxidantes catalase e glutational peroxidase), sugerindo a interação direta entre creatina e agentes oxidantes e/ou radicais livres (SESTILI *et al.*, 2006). O efeito protetor da creatina contra o dano ao DNA e RNA é resultado da sua capacidade de remover radicais livres de forma direta (FIMOGNARI *et al.*, 2009; GUIDI *et al.*, 2008).

Trabalhos mostram que as alterações energéticas, principalmente aquelas relacionadas a desregulação da via Creatina/CK, estão associadas a um aumento da inflamação (KITZENBERG; COLGAN; GLOVER, 2016). O aumento da concentração intracelular de creatina e PCr promovido pela suplementação pode exercer efeitos benéficos em distúrbios

inflamatórios e isquêmicos (KITZENBERG; COLGAN; GLOVER, 2016; ROY; LEE, 2016). Já foi relatado que a suplementação de creatina é capaz de reduzir os níveis de citocinas inflamatórias circulantes depois de uma competição de meio- *Ironman* (BASSIT; CURI; ROSA, 2008). Em cultura de células observou-se que a creatina reduz a permeabilidade endotelial e a diapedese de neutrófilos, através da redução da expressão de moléculas de adesão (NOMURA *et al.*, 2003).

Apesar da ação profilática da suplementação de creatina em doenças que promovem aumento da proteólise, poucos trabalhos estudaram a suplementação como um coadjuvante para reduzir os distúrbios causados pela caquexia induzida pelo câncer. Deminice *et al.* (2016a) suplementou ratos Wistar com creatina em um modelo de 10 dias de tumor de Walker-256 e a suplementação foi capaz de prevenir a perda de peso corporal induzida pelo tumor, além de diminuir o estresse oxidativo hepático, indicando que a suplementação exerça uma ação antioxidante. No estudo de Campos-Ferraz *et al.* (2016) a suplementação de creatina, em ratos inoculados com células tumorais de Walker-256, foi capaz de atenuar o crescimento do tumor e a inflamação associada a caquexia, porém não se sabe ao certo por quais mecanismos, além disso a acidose metabólica foi atenuada.

Outro mecanismo que parece estar relacionado ao potencial da creatina em diminuir a perda de massa corporal induzida por doenças é devido ao fornecimento de grande quantidade de energia química no citosol. Isso ocorre devido à rápida difusão da PCr e da creatina entre regiões com alta produção e alta demanda energética, que compensa a lenta difusão do ATP e ADP. A enzima CK tem grande participação nesse processo, pelas suas isoformas citosólicas e mitocondriais (CAMPOS-FERRAZ *et al.*, 2016; MARTIN *et al.* 1994; PEARLMAN; FIELDING, 2006; WALLIMANN; TOKARSKA-SCHLATTNER; SCHLATTNER, 2011;). A creatina, além de atuar na bioenergética (pelo acoplamento do sistema PCr/CK ao transportador de adenina nucleotídeo) é capaz de reduzir a formação de ERO e inibir a transição da permeabilidade mitocondrial, diminuindo a proteólise e apoptose da célula muscular, como apresenta a tabela 1 (WALLIMANN; TOKARSKA-SCHLATTNER; SCHLATTNER, 2011; YAN, 2016).

Tabela 1- Efeitos pleiotrópicos da creatina para função e proteção celular**Efeitos energéticos da creatina**

Melhora o estado energético da célula (PCr/ATP) e o desempenho muscular	(Harris et al. 1992; Greenhaff et al. 1993)
Facilita o transporte de energia intracelular	(Wallimann 1975; Saks et al. 1978, 2006b; Bessman and Geiger 1981; Wallimann and Eppenberger 1985; Bessman 1986; Wallimann et al. 1992, 1998; Kaasik et al. 2003; Wallimann et al. 2007)
Melhora a eficiência da utilização de energia	(Rossi et al. 1990; Steeghs et al. 1997; Pulido et al. 1998; van Leemputte et al. 1999)
Estimula a respiração mitocondrial (melhorando a oferta de energia)	(Kay et al. 2000; Meyer et al. 2006)
Estabiliza o complexo mitocondrial PTP atuando como protetor mitocondrial (anti-apoptótico)	(O’Gorman et al. 1997a; Dolder al. 2003; Hatano et al. 2004)

Efeitos antioxidantes e anti apoptóticos da Creatina

Ação antioxidante direta	(Lawler et al. 2002)
Forte antioxidante indireto na mitocôndria	(Meyer et al. 2006; Sestili et al. 2006)
Reduz o dano oxidativo ao DNA, especificamente no DNA mitocondrial	(Guidi et al. 2008)
Atualiza as enzimas para a defesa ao EO	(Young et al. 2010)
Proteção <i>in vivo</i> de toxinas mitocondriais	(Hosamani et al. 2010)

Outros efeitos da Creatina

Induz a expressão de diferentes fatores de transcrição	(Hespel et al. 2001; Louis et al. 2004; Deldicque et al. 2008; Safdar et al. 2008)
Reduz os marcadores de inflamação durante o exercício resistido	(Santos et al. 2004; Bassit et al. 2008)
Ativa a sinalização celular e melhora a diferenciação das células musculares	(Ceddia and Sweeney 2004; Louis et al. 2004; Deldicque et al. 2007,2008)
Diminui os níveis de homocisteína e peroxidação lipídica (fatores de risco cardíaco)	(Deminice et al. 2009)
Atua como osmólito, protegendo as células contra o estresse hipertônico	(Alfieri et al. 2006)
PCr se liga nas membranas celulares, estabiliza e protege as membranas celulares de eritrócitos	(Saks et al. 1996; Tokarska-Schlattner et al. 2003, 2005a)

Fonte: Walliman; Tokarska-Schlattner; Schlattner (2011). Adaptada pelo autor deste trabalho.

4 MÉTODOS

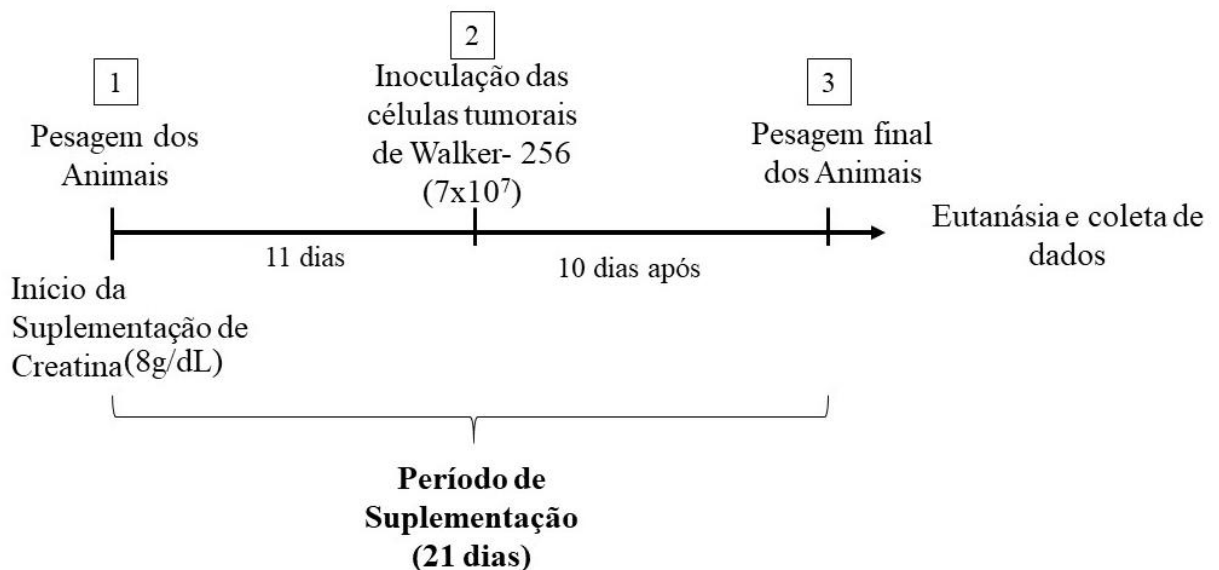
4.1 Animais e tratamento

O experimento foi conduzido com 24 ratos Wistar machos pesando entre 220-240g, provenientes do Biotério Central e mantidos no Biotério do Departamento de Ciências Patológicas da Universidade Estadual de Londrina. Os animais foram acomodados em gaiolas coletivas contendo no máximo 5 animais, com ração (Nuvilab CR-1, Nuvital) e água *ad libitum*. Os animais foram divididos randomicamente em três grupos: grupo controle (C), inoculados com tumor (T) e grupo inoculados com tumor e suplementados com Creatina (TCr). Todos os procedimentos experimentais foram iniciados somente após aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Londrina (nº 17628.2012.6).

4.2 Delineamento experimental

Após uma semana de ambientação ao biotério experimental, os animais do grupo tumor-creatina iniciaram a suplementação com creatina adicionada à água de beber (*ad libitum*) numa concentração de 0,8g/dL (DEMINICE *et al.*, 2016). Os animais dos grupos controle e tumor mantiveram sua ingestão de água normal. Em todos os grupos, a ingestão de água foi monitorada diariamente para determinar a ingestão de creatina. Após 10 dias de suplementação, os animais do grupo tumor e tumor- creatina foram inoculados com as células tumorais de Walker-256. A eutanásia exsanguinação ocorreu 10 dias após a inoculação do tumor, completando 21 dias de suplementação (figura 1).

Figura 1 - Delineamento do estudo.



Fonte: Elaborada pelo autor deste trabalho. Delineamento do estudo separado em três momentos: 1- Pesagem de todos os animais e início da suplementação de creatina para os animais do grupo TCr; 2- inoculação do tumor de Walker-256 nos grupos T e TCr e 3- Pesagem, eutanásia e coleta de dados de todos os animais.

4.3 Implantação do tumor

O tumor de Walker 256, um carcinoma mamário, foi mantido em laboratório através de passagens semanais de células viáveis para a cavidade abdominal de ratos Wistar adultos machos como tumor ascítico intraperitoneal ($2,0 \times 10^7$ de células suspensas em 0,5 ml PBS). No momento da inoculação, as células tumorais foram removidas da cavidade peritoneal (com 8 μ l/ml de 5000 IU/ml heparina) e centrifugadas a 1.000 xg, e coletada a fase intermediária. Para indução do tumor sólido durante a fase experimental, células viáveis de Walker-256, determinadas pelo método de contagem em câmara de Neubauer e exclusão pelo azul de Tripán, foram retiradas do peritônio e inoculadas subcutâneamente no flanco direito dos animais dos grupos tumor e tumor-creatina na concentração $7,0 \times 10^7$ células em 0,5 ml de PBS.

4.4 Eutanásia e preparação do Tecido

Aos 21 dias de experimento, todos os animais foram anestesiados com uma injeção intramuscular de ketamina e xilazina (100mg/kg e 13mg/kg, respectivamente) e sofreram abertura da cavidade abdominal para punção da aorta abdominal e coleta de sangue. O sangue foi coletado em tubos heparinizados, centrifugado à 1000 x g e o plasma separado e armazenado a -80°C para posterior análise bioquímica. Os músculos sóleo, tibial anterior (TA), plantar (PL), gastrocnêmio, EDL (extensor longo dos dedos) foram dissecados e pesados. A soma desses músculos foi utilizada como parâmetro de massa muscular. Parte dos músculos sóleo e EDL foram utilizadas para análise histológica (avaliação da área de secção transversa da fibra) e outra parte armazenada a -80°C para futuras análises. A parte branca do gastrocnêmio foi separada para análise de estresse oxidativo. O baço também foi retirado e pesado para análise histológica e as gorduras epididimal e retroperitoneal foram retiradas e pesadas para representar a somatória do tecido adiposo.

Os tumores foram cuidadosamente dissecados e pesados, uma parte do tumor foi separada para análises histológica.

4.5 Análise Histológica

Os cortes histológicos do músculo esquelético (sóleo e EDL), do baço e do tumor foram realizados em amostras após a inclusão em parafina, seguindo o protocolo descrito por

Fonseca et al. (2012). Resumidamente, as amostras foram fixadas em paraformaldeído (4%) e depois lavadas com tampão fosfato. Posteriormente, as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol (70%, 96%, 100%), diafanizadas, impregnadas com parafina e cortadas em micrótomo (LUPETEC, MRP, 2015) com 5 µm de espessura, de forma semi-seriada.

Ambos os músculos e o baço foram cortados transversalmente e corados com hematoxilina e eosina. Após a coloração, imagens representativas (aumento de 200 vezes) foram adquiridas digitalmente em microscópio de luz com câmera acoplada (Olympus BX41®) e a área de secção transversa dos músculos, o tamanho do folículo e a porcentagem da polpa branca do baço foram calculadas com o auxílio do programa *Image J*. O tecido tumoral também foi cortado transversalmente para investigação do tamanho da cápsula tumoral e da deposição de tecido conjuntivo. Para tal, os cortes foram corados com *Sirius-Red*, e analisados com o programa *Image J* após a aquisição de imagens (aumento de 200 vezes para a região central do tumor e aumento de 100 vezes para observação da cápsula).

A quantificação das células tumorais em divisão foi realizada através de imunohistoquímica para o marcador de proliferação celular Ki67. Resumidamente, os cortes foram permeabilizados com 0,1% de Triton X-100, por 1 hora, lavadas três vezes em tampão fosfato de potássio, e incubadas durante 40 minutos com solução de soro albumina bovina a 10%. Os cortes foram incubados durante duas horas, a temperatura ambiente com o anticorpo primário anti-Ki67 (Abcam®, SP6- ab 16667, diluição 1:50). Na sequência, as amostras foram incubadas com o anticorpo secundário (Sigma Aldrich- P1291, diluição 1:200), durante duas horas a temperatura ambiente. A atividade da peroxidase foi visualizada após adição de peróxido de hidrogênio e 3,3'-7 diaminobenzidina, durante 5 minutos. A quantidade de área marcada foi calculada após a aquisição de imagens representativas (aumento de 200 vezes), utilizando-se também o programa *Image J*. A apoptose das células tumorais foi calculada pelo teste de TUNEL utilizando-se um kit comercialmente disponível (TREVIGEN, TACS® 2 TdT- DAB *In Situ* Apoptoses Detection Kit), seguindo as recomendações do fabricante. A quantificação da área marcada, correspondente à extensão da apoptose foi determinada com o auxílio do programa *Image J*.

4.6 Estresse oxidativo muscular, citocinas plasmáticas e contagem total de leucócitos

O estresse oxidativo foi determinado no músculo gastrocnêmio. A concentração de malondialdeído no músculo (MDA) foi determinada por MDA-MP (reação com 1-metil-2-fenolendol) adaptado de Spirlandeli et al. (2014). Concentrações musculares de GSH e

glutathiona oxidada (GSSG) foram quantificadas de acordo com o método descrito por Rahman, Kode e Biswas (2006).

Para análise dos marcadores inflamatórios sistêmicos foi utilizado o kit ELISA Ready-SET-Go da eBioscience, para a interleucina 6 (IL-6 ref. 88-7064-88), interleucina 10 (IL-10 ref. 88-7105-88) e tumor de necrose tumoral-alfa (TNF- α ref. 88-7340-88). A contagem total de leucócitos foi mensurada usando o contador automático BR[®] Accuri Cr.

4.7 Biologia Molecular

Expressão Gênica

O RNA foi isolado de 100 mg do músculo sóleo usando o kit RiboPure (Ambion, part number AM 1924, USA) seguindo as instruções do fabricante. O RNA total foi quantificado por espectrofotometria, analisando-se a densidade óptica a 260 e 280 nm (NanoDrop2000c, ThermoScientific, USA). Foi realizado um tratamento adicionando-se DNase (DNA-free Kit, Ambion, part number AM1906, USA) para remover DNA contaminante. O cDNA foi posteriormente sintetizado utilizando-se 1000 ng de RNA através de kit (Applied Biosystems, part number 4374966, USA) de alta capacidade de transcrição reversa. A quantificação foi realizada através de PCR em tempo real utilizando-se o equipamento 7500 Fast Real-time PCR System (Applied Biosystems, USA). Foram utilizadas as seguintes sondas de expressão gênica Taqman[®] Gene Expression probes (Applied Biosystems, USA): Fbxo32 (F-box proteína 32) Rn00591730_m; mTOR (mechanistic target of rapamycin (serine/threonine kinase) Rn00571541_ml. A beta-actina foi usada como gene de referência para a normalização da reação. A quantificação relativa foi determinada pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Imunoblotting

O músculo EDL e sóleo foram homogenizados em tampão contendo 50 mM de HEPES, 40mM NaCl, 2mM EDTA, 1,5mM Na₃VO₄, 50mM NaF, 10mM fosfato de sódio, 10 mM betaglicerofosfato de sódio, 1% Triton-X 100 e um coquetel inibidor de protease (cOmplete[™], CO- RO ROCHE), depois as amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm à 4°C. O sobrenadante foi isolado e a proteína foi dosada pelo kit padrão QPRO-BCA (Cyanagen Srl). Após a quantificação da proteína as amostras foram separadas num gel 10% e transferidas para a membrana PVDF (Bio-Rad, Immun- Blot[®]). A membrana foi bloqueada com leite 5% e imunotransferida com os anticorpos primários de FBXO32 (ab74023, Abcam, UK), MURF-1 (ab172479, Abcam, UK), SOD1 (#2770; CST) e GAPDH (G9545, Sigma-Aldrich[®]). Para o anticorpo secundário foi utilizado o *Anti-Rabbit* IgG (Bio-Rad laboratories, USA). As proteínas foram reveladas com ECL (Clarity[™] Western ECL Substrate) da BIO-

RAD e as bandas foram detectadas por filme radiográfico. A densitometria das bandas foi quantificada pelo programa Image J. Como controle de normalização para o EDL foi utilizado o GAPDH devido à ausência de alterações significativas entre as bandas dos grupos, para normalização do músculo sóleo foi utilizado o ponceau. A normalização foi feita dividindo o valor da densitometria bruta de cada banda de interesse pelo valor da densitometria bruta do GAPDH ou ponceau e então calculou-se a média e desvio padrão para cada grupo.

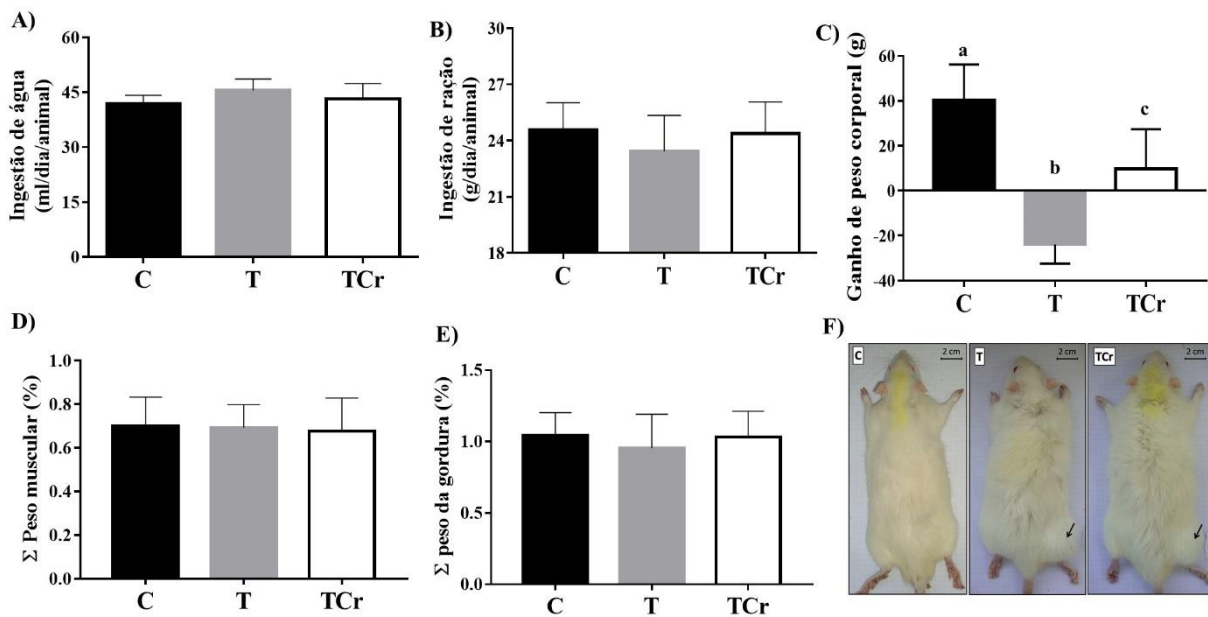
4.8 Análises estatísticas

A normalidade de distribuição dos dados foi analisada pelo teste de Shapiro-wilk. Os dados que assumiram distribuição normal foram apresentados em valores de média e desvio padrão, para comparação dos resultados paramétricos e intergrupais recorre-se à ANOVA one-way seguido de *post-test* de Tukey para comparações entre apenas dois grupos foi adotado o *test t* independente. Para a área de secção transversa dos músculos sóleo e EDL que não cumpriram a suposição de normalidade utilizou-se a mediana e quartis (25-75%) pelo teste de Kruskal- Wallis com *post-hoc* de Dunn's. O nível de significância adotado foi de $P < 0,05$. Os programas Origin 8.6 e GraphPad Prisma 5 foram utilizados para as análises.

5 RESULTADOS

O desenvolvimento das células tumorais do tumor Walker-256 não interferiu na ingestão de água ou comida (figura 2A e 2B, respectivamente), mas reduziu o ganho de peso corporal dos animais (figura 2C). Dez dias de crescimento tumoral não alterou o peso do músculo ou da gordura (figura 2D e 2E). A ingestão de creatina no grupo tumor-creatina foi de $1,02 \pm 0,1$ g/kg/dia. Essa concentração de creatina mitigou a perda de peso corporal demonstrada pelo ganho de peso corporal na figura 2C.

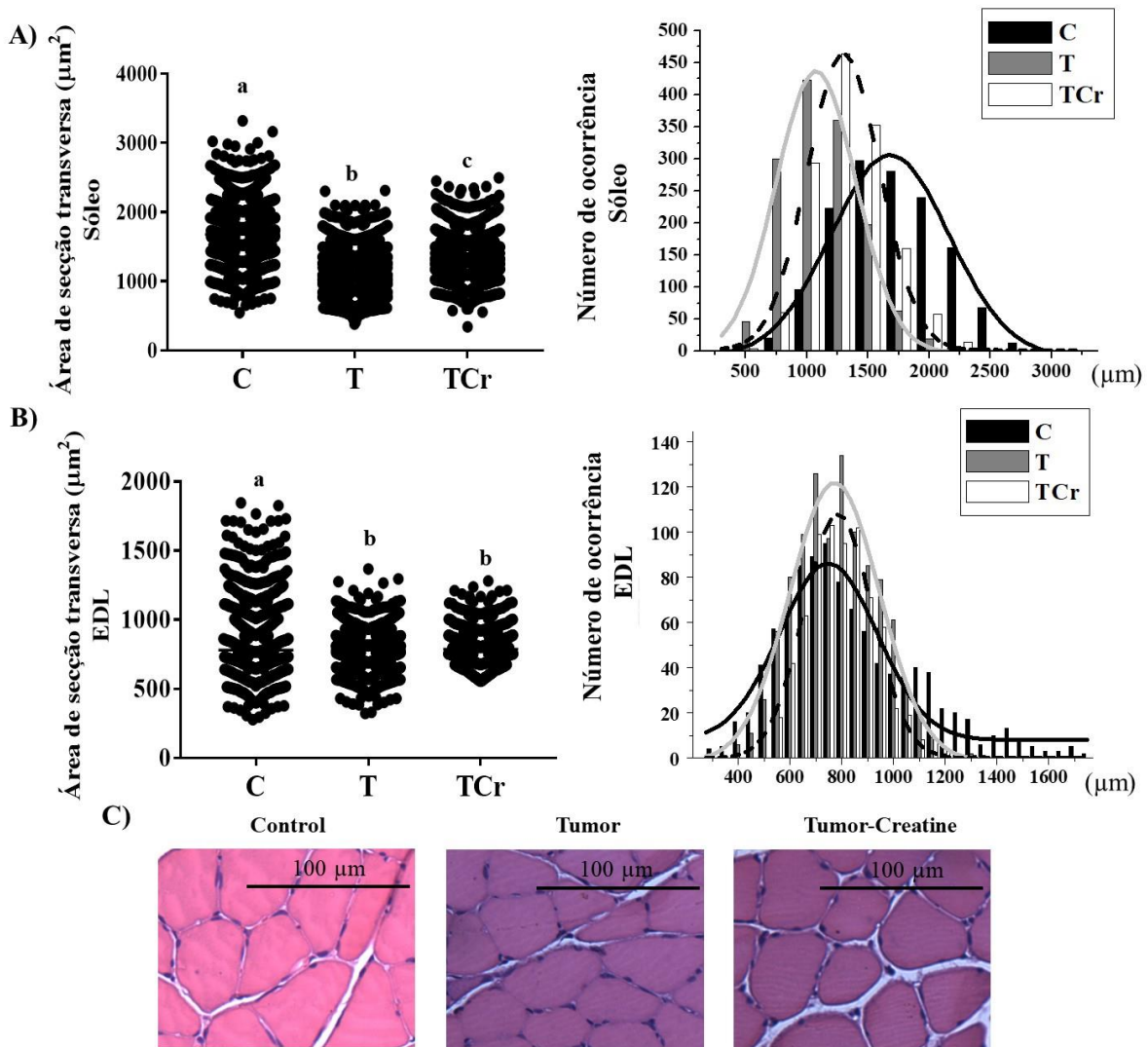
Figura 2 – Avaliação dos parâmetros gerais dos animais



Fonte: Elaborada pelo autor deste trabalho. (A) Ingestão média de água; (B) ingestão de ração; (C) ganho de peso corporal; (D) Σ do peso dos músculos (sóleo, EDL, PL, gastrocnêmico e tibial anterior); (E) Σ do peso da gordura (epididimal e retroperitoneal); (F) imagens representativas dos animais no dia da eutanásia dos grupos controle (C), tumor (T) e tumor-creatina (TCr). Valores expressos por média e desvio padrão, médias com letras diferentes apresentam uma diferença com significância entre elas ($P < 0,05$) por ANOVA *one-way* seguido de *post-test* de Tukey, ou *teste t* para amostra independentes.

O desenvolvimento do tumor promoveu atrofia no músculo esquelético, o que pode ser observado na redução da área de secção transversa do músculo sóleo e EDL quando comparados ao grupo controle (figura 3A e 3B, respectivamente). A suplementação de creatina foi capaz de atenuar a atrofia promovida pelo tumor no músculo sóleo (figura 3A), mas nenhuma alteração foi encontrada no músculo EDL.

Figura 3 - Áreas de secção transversa (ASTr) marcada com H&E do músculo sóleo e EDL.

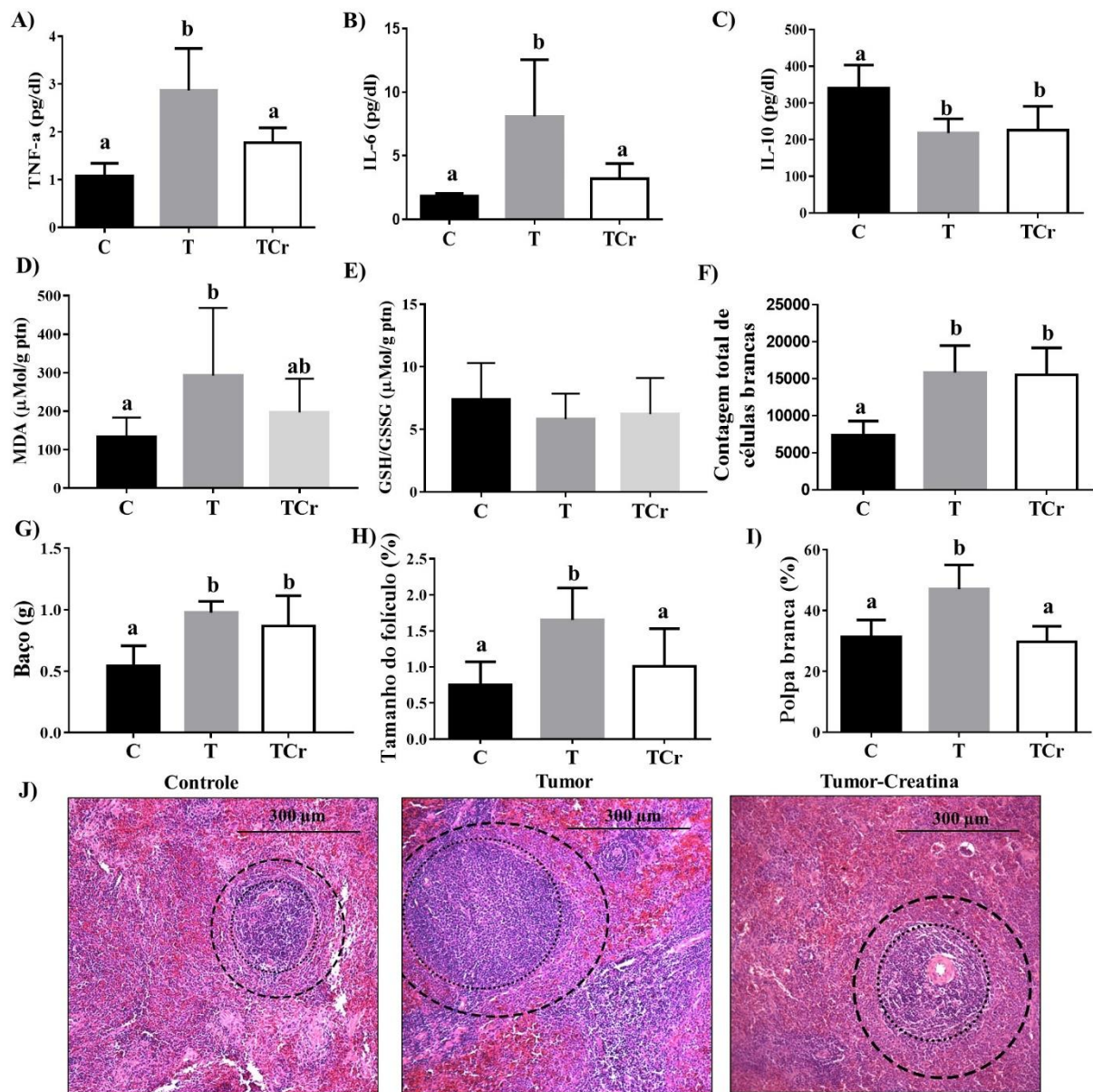


Fonte: Elaborada pelo autor deste trabalho. Gráfico de dispersão à esquerda e distribuição da área de secção transversa pelo número de ocorrência à direita do músculo sóleo (A); gráfico de dispersão à esquerda e a área de secção transversa distribuída pelo número de ocorrência à direita do músculo EDL (B); imagens histológicas representativas do corte transversal do músculo sóleo (C) dos grupos controle (C), tumor (T) e tumor-creatina (TCr). Valores com letras diferentes apresentam uma diferença com significância ($p < 0,05$) pelo teste Kruskal-Wallis e post-hoc de Dunn's).

Os níveis plasmáticos de TNF- α e IL-6 foram, respectivamente, 166% e 347% mais altos no grupo tumor quando comparados ao controle (figura 4A e 4B). Além disso, o grupo tumor apresentou redução nos níveis de IL-10, aumento do MDA e na contagem total de leucócitos assim como aumento no tamanho do baço (figura 4C, 4D, 4F e 4G). Por outro lado, a suplementação de creatina preveniu o aumento dos níveis plasmáticos do TNF- α e IL-6. A suplementação de creatina também preveniu o aumento do tamanho do folículo e da polpa branca (figura 4H e 4I) induzido pelo crescimento do tumor, apesar de não ter sido capaz de

prevenir tanto o aumento no tamanho do baço como o aumento dos leucócitos circulantes do grupo tumor.

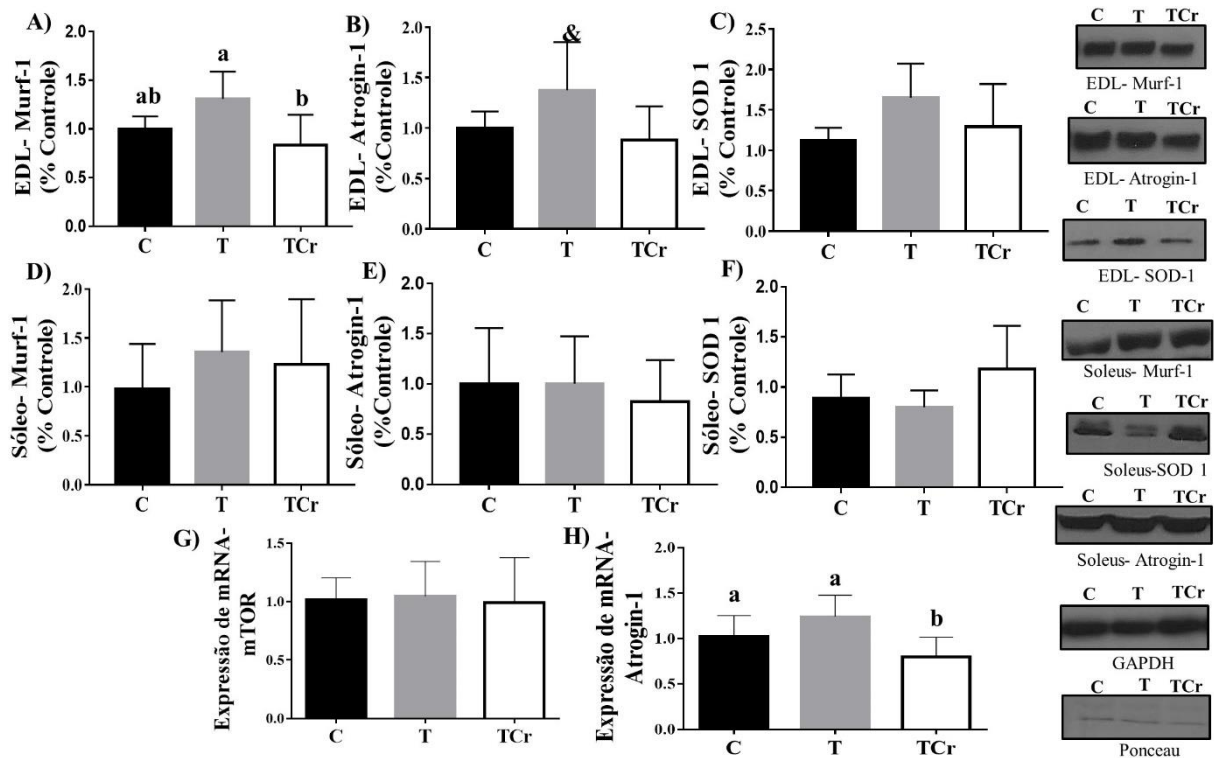
Figura 4 - Análises do estresse oxidativo muscular e inflamação.



Fonte: Elaborada pelo autor deste trabalho. Níveis plasmáticos de fator de necrose tumoral - alfa (TNF- α) (A), interleucina- 6 (IL-6) (B) e interleucina-10 (IL-10) (C); níveis de malondialdeído (MDA) no músculo gastrocnêmico (D) e razão de glutatona reduzida e oxidada (GSH/GSS) (E); contagem total de células brancas (F); peso do baço (G); cortes transversais do baço corados com H&E para análises do tamanho do folículo (H) e porcentagem de área da polpa branca (I); Imagens representativas da histologia do baço, — — representa a polpa branca e - - - - tamanho do folículo (J). dos grupos C (controle), T (tumor) e TCr (tumor-creatina). Valores expressos por média e desvio padrão, médias com letras diferentes apresentam uma diferença com significância entre elas ($P < 0,05$) por ANOVA *one-way* seguido de *post-test* de Tukey.

A avaliação da sinalização de degradação proteica está apresentada na figura 5. A suplementação de creatina preveniu o aumento induzido pelo crescimento do tumor nos níveis de Murf-1 ($p < 0,05$) e Atrogin-1 ($p = 0,06$) no músculo EDL (figura 5A e 5B). O mesmo, entretanto, não foi observado no músculo sóleo (5D e 5E). A suplementação de creatina foi capaz de prevenir o aumento dos níveis de Atrogin-1 mRNA (figura 5H). Nenhuma alteração nos níveis de Mtor mRNA foi encontrada (figura 5G). Os níveis da SOD1 não alteraram em nenhum grupo em ambos os músculos analisados. (Figura 5C e F). Não foi encontrada diferença nos níveis de mTOR mRNA entre os grupos nas análises de RT-PCR no músculo sóleo.

Figura 5 - Análise da síntese e da degradação de proteínas no músculo esquelético.

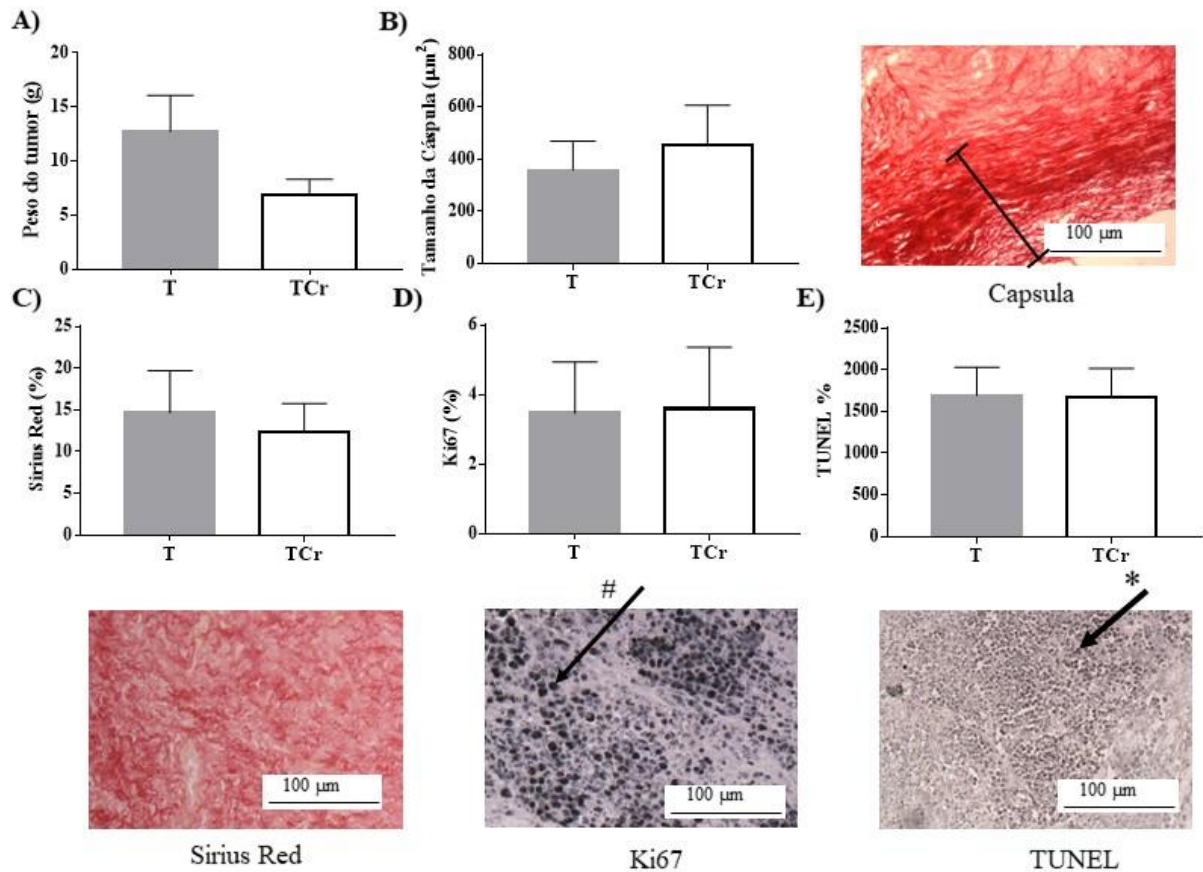


Fonte: Elaborada pelo autor deste trabalho. Níveis de Murf-1 (A), Atrogin-1(B) Esod1 (C) no músculo EDL (imagens representativas ao lado direito); Níveis de Murf-1 (D) e Atrogin-1 (E) e SOD1 (F) (imagens representativas ao lado direito). Expressão de mRNA do músculo sóleo; Imagem representativa do controle de normalização GAPDH para o músculo EDL e imagem representativa do controle de normalização Ponceau para o músculo Sóleo. Níveis de mRNA da mTOR (G) e Atrogin-1 (H) da expressão de mRNA no músculo sóleo dos grupos controle (C), tumor (T) e tumor-creatina (TCr). Valores apresentados em média e desvio padrão. Médias com letras diferentes apresentam diferença com significância ($P < 0,05$) e & representa $p = 0,06$ quando comparado T com TCr por ANOVA *one-way* seguido por *post test* de Tukey.

Além da suplementação de creatina atuar a nível sistêmico e muscular, a creatina foi capaz de reduzir significativamente o tamanho do tumor em 46%. Entretanto apesar do resultado promissor na redução do tamanho do tumor, nas análises histológicas processadas no tecido tumoral nenhuma alteração que justificasse a redução do peso do tumor em

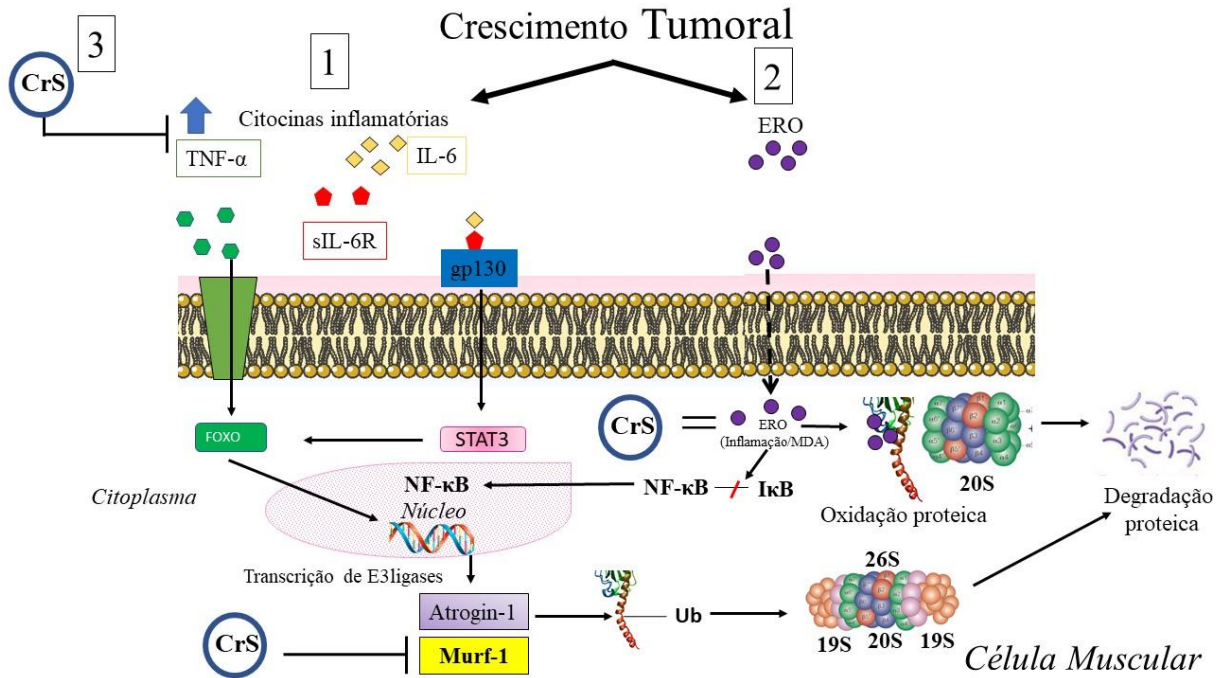
decorrência da suplementação de creatina foi encontrada. A taxa de proliferação tumoral (figura 6A), a apoptose (figura 6B), a deposição de colágeno (figura 6C) nas regiões central, intermediária e periférica do tumor e o tamanho da cápsula (Figura 6D) não apresentaram diferença estatística.

Figura 6 - Análises tumorais.



Fonte: Elaborada pelo autor deste trabalho. Peso do tumor(A); tamanho da cápsula (B); Coloração com *Sirius Red* (C); Proliferação Tumoral com marcação do antígeno Ki67 (D); Apoptose determinada por TUNEL (E) dos grupos tumor (T) e tumor-creatina (TCr), on # representa as células tumorais marcadas com o antígeno Ki67 e *células apoptóticas. Valores expressos por média e desvio padrão, médias com letras diferentes apresentam uma diferença com significância entre elas ($P < 0,05$) por *teste t* para amostra independentes.

Figura 7- Resumo Ilustrativo dos efeitos da suplementação de creatina na sinalização para proteólise muscular esquelética em ratos portadores de tumor de Walker-256.



Fonte: Elaborada pelo autor deste trabalho. 1- Aumento de citocinas inflamatória sistêmicas (TNF- α e IL-6) pelo desenvolvimento tumoral, as quais ativam genes específicos que resultam na transcrição de E3 ligases no núcleo da célula e promovem o reconhecimento da proteína para ser ligada à proteína Ub (ubiquitina) e posteriormente degradada pelo barril proteassomal em peptídeos. 2- Ativação da degradação direta de proteínas pela porção 20s do barril proteassomal através da oxidação de proteínas pelas ERO (espécies reativas de oxigênio) e/ou oxidação do fator de Inibição κ B (I κ B) e translocação do fator de transcrição nuclear κ B (NF κ B) para o núcleo onde promove a ativação da transcrição de E3 ligases. 3- Ação da suplementação de creatina na redução das citocinas inflamatórias e na normalização dos níveis de MDA (malondialdeído) e consequente diminuição das E3 ligases, atrogin-1 e Murf-1.

6 DISCUSSÃO

Os principais achados do presente estudo foram 1) a suplementação de creatina preveniu a perda de peso corporal e a atrofia do músculo esquelético induzida pelo desenvolvimento do tumor; 2) devido aos seus efeitos anti-inflamatórios 3) e da diminuição da sinalização pró-atrófica via expressão de Murf-1 e Atrogin-1, importantes E3 ligases para ativação do sistema UP.

Estudos demonstraram que a suplementação de creatina previne a perda de massa corporal em pacientes com artrite reumatoide (WILKINSON *et al.*, 2016), doença pulmonar obstrutiva crônica (FULD *et al.*, 2005), distrofia de Duchenne (TARNOPOLSKY *et al.*, 2004) e imobilização (AOKI *et al.*, 2004). Os autores especulam que esta melhora pode ser baseada na capacidade da creatina em reter água devido a suas propriedades osmóticas (AOKI *et al.*, 2004), o que sugere que o estado de hidratação da célula é um fator importante no controle do *turnover* proteico, e está relacionado à via MAPK (proteína quinase ativada por mitógeno), que desempenha um papel importante na regulação da síntese proteica (AOKI *et al.*, 2004; FULD *et al.*, 2005). Outros autores acreditam que os efeitos da suplementação na proteção do peso corporal estejam relacionados com 1) sua ação antioxidante (FIMOGNARI *et al.*, 2009; GUIDI *et al.*, 2008; LAWLER *et al.*, 2002) 2) sua ação anti-inflamatória (BASSIT; CURI; ROSA, 2008; CAMPOS-FERRAZ, 2016) 3) sua capacidade de aumentar a diferenciação de células miogênicas C2C12 pela via p38 e Akt/PKB (DELDICQUE *et al.*, 2007; XU; LIN; HUANG, 2017) e 4) sua interação em vias de degradação atenuando os níveis da p53 (proteína responsável pela apoptose no músculo), permitindo que a célula sobreviva (RAHIMI *et al.*, 2015).

A caquexia pode predizer uma condição irreversível nos pacientes, principalmente os com câncer (EVANS *et al.*, 2008; VIGANO *et al.*, 2004). A partir dos resultados promissores da suplementação de creatina na proteção da massa muscular, em diversas situações patológicas ou não, a creatina parece ser uma ferramenta eficaz para atenuar a caquexia. Nosso estudo demonstrou que o efeito protetor da suplementação de creatina contra a atrofia muscular está relacionado à sua capacidade de combater o estado inflamatório sistêmico imposto pelo crescimento do tumor. O que está de acordo com outros estudos que apresentaram a ação anti-inflamatória da creatina em modelos de artrite induzida por carragenina, nistatina e por formaldeído (KHANNA; MADAN, 19778; RIESBERG *et al.*, 2016). Além disso, já foi relatado aumento da expressão do PPAR α pela suplementação de creatina, gene responsável por exercer efeitos anti-inflamatórios sobre a musculatura esquelética num modelo de esteatose hepática (DEMINICE *et al.*; 2011). Riesberg *et al.*

(2015) encontrou redução na IL-6 de macrófagos de camundongos pré- tratados com creatina. Campos-Ferraz *et al.* (2016) observou que a suplementação reduziu IL-6 e aumentou a citocina anti-inflamatória IL-10 em um modelo de 15 dias de tumor Walker-256. Nossos resultados corroboram com esses achados, mostrando que a suplementação de creatina previne o aumento de TNF- α e IL-6 plasmática promovido pelo desenvolvimento do tumor, ambas citocinas são importantes mediadores no processo caquético do câncer (FEARON; GLASS; GUTTRIDGE; 2012; NARSALE; CARSON, 2014; YUAN *et al.*, 2015).

Ainda com relação aos efeitos da suplementação de creatina na inflamação promovida pelo tumor, apesar da suplementação não prevenir a esplenomegalia, foi capaz de atenuar o aumento do tamanho do folículo e da polpa branca do baço, observados microscopicamente. Em conjunto, esses dados sugerem um efeito anti-inflamatório sistêmico da suplementação de creatina nos animais com tumor. Além da inflamação, os animais com tumor apresentaram aumento de lipoperoxidação muscular, observado pelos níveis de MDA. Apesar da suplementação não reverter a lipoperoxidação induzida pelo tumor, houve uma normalização dos níveis de MDA nos animais suplementados.

Em conjunto, sabe-se que inflamação e estresse oxidativo são capazes de ativar o sistema UP, um dos principais responsáveis pela degradação proteica na caquexia do câncer (POWERS; DUARTE; KAVAZIS; TALBERT, 2010). Já foi relatado que altas concentrações de TNF- α promovem um aumento nos níveis de atrogin-1 em células de miotubos C₂C₁₂, através do aumento da Foxo-4 (LARICHAUDY *et al.*, 2012; MOYLAN *et al.*, 2008). E foi encontrado também que o aumento de IL-6 circulante em camundongos Apc^{Min/+} aumentou os níveis de atrogin-1 (BALTGALVIS *et al.*, 2009). Nesse trabalho, nós demonstramos que a suplementação de creatina foi capaz de reduzir a expressão de mRNA para atrogin-1 no músculo sóleo, diminuir os níveis de Murf-1 (p<0,05) e a atrogin-1 (p=0,06) no músculo EDL. Esses dados são novos e pioneiros e provavelmente estejam relacionados com a ação da suplementação de creatina na inflamação sistêmica.

Apesar dos trabalhos de Deminice *et al.* (2016) e de Campos-Ferraz *et al.* (2016) analisarem o efeito da suplementação de creatina em diferentes perturbações causadas pelo câncer, nenhum destes trabalhos investigou o microambiente tumoral. Devido às ações protetoras da suplementação de creatina a nível sistêmico, muscular e também à redução da massa tumoral encontradas nesse trabalho, nós decidimos verificar se os seus efeitos benéficos estender-se-iam também ao microambiente tumoral. Surpreendentemente a suplementação de creatina não alterou nenhum dos parâmetros relacionados com

agressividade tumoral investigados, como tamanho da cápsula, apoptose, proliferação celular e deposição de colágeno tumoral.

A participação da creatina, da PCr e da creatina quinase (CK) no desenvolvimento tumoral foi estudada em 2008, por Patra *et al.*, que observaram redução dos níveis de creatina em miosarcoma de ratos à medida que o tumor se desenvolvia. Embora estes mecanismos não tenham sido investigados, os autores não descartaram a participação da creatina como fonte de energia para a proliferação tumoral. O mesmo grupo, em 2012, buscou entender os efeitos da suplementação com creatina associada ao ácido ascórbico e ao metilglioal na progressão tumoral (PATRA *et al.* 2012). Os autores observaram que a associação estudada restaurou os níveis de CK e de sMitCK (*sarcomeric mitochondrial CK*) tumoral e isso foi acompanhado da ausência de sinais de desenvolvimento tumoral. Neste trabalho, nós não acreditamos que a suplementação de creatina realizada possa ter sido utilizada para a proliferação tumoral, uma vez que esta foi a mesma nos dois grupos, apesar do aumento da disponibilidade de creatina no tecido tumoral dos animais suplementados (dados não mostrados).

Apesar dos efeitos benéficos da suplementação de creatina descritos nesse trabalho, já foi demonstrado que a suplementação não é capaz de alterar a sobrevida dos animais com câncer (DEMINICE *et al.*, 2016). Entretanto, quando associada a outras substâncias, como metilglioal e ácido ascórbico, a suplementação de creatina foi capaz de prolongar a sobrevida dos animais com sarcoma quando comparado aos animais não suplementados (PAL; ROY; RAY, 2016). Estudos futuros podem investigar a associação da creatina com medicamentos quimioterápicos em doses reduzidas na proteção da caquexia do câncer.

Nossos resultados fornecem evidências iniciais de que a suplementação de creatina pode mitigar a caquexia do câncer, a perda de massa muscular e o crescimento do tumor de Walker-256. Estudos futuros devem investigar, em níveis mecanicistas, se a suplementação de creatina atenua a perda de massa óssea, o crescimento do tumor em diferentes modelos e diferentes períodos de suplementação. Acreditamos que a análise de E3 ligases específicas do músculo esquelético, envolvidas na caquexia do câncer, pode embasar a descoberta de novas drogas e diferentes tratamentos para a caquexia do câncer.

7 CONCLUSÃO

Em conclusão, a suplementação de creatina previne o desenvolvimento da caquexia do câncer, reduzindo a atrofia muscular e atenuando o ambiente pró-inflamatório induzido pelo tumor, condição essa responsável por diminuir a expressão de importantes reguladores da degradação de proteínas mediada pelo sistema UP, como a atrogin-1 e a Murf-1. Apesar da significativa redução no tamanho do tumor, a suplementação de creatina não mitigou a agressividade tumoral sendo necessárias análises mais específicas no tecido tumoral para compreender a ação da suplementação de creatina nesse tecido.

REFERÊNCIAS

- AIKEN, C. et al. Oxidative stress-mediated regulation of proteasome complexes. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 10, n. 5, p. 1-11, 2011.
- ALVES, C. R. R. et al. Creatine Supplementation in Fibromyalgia: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. **Arthritis Care & Research**, v. 65, n. 9, p. 1449-1459, 2013.
- ARGILÉS, J. M. et al. Cancer Cachexia: Understanding the molecular basis. **Nature Reviews Cancer**, v. 14, n. 11, p. 754-762, 2014.
- AOKI, M. S. Deleterious effects of immobilization upon rat skeletal muscle: Role of creatine supplementation. **Clinical Nutrition**, v.23, p. 1176-1183, 2004.
- BALKWILL F. R.; MANTOVANI A. Cancer-related inflammation: Common themes and therapeutic opportunities. **Seminars in Cancer Biology**, v. 22, p.33-40, 2012.
- BALTGALVIS, K. A. et al. Muscle wasting and Interleukin-6-induced Atrogin-1 Expression in the cachectic *Apc^{min/+}* Mouse. **Pflugers Archiv- European Journal of Physiology**, v.457, n.5, p. 989-1001, 2009.
- BASSIT, R. A.; CURI, R.; ROSA, L. F. C. Creatine supplementation reduces plasma levels of pro-inflammatory cytokines and PGE2 after a half-ironman competition. **Amino Acids**, v. 35, n. 2, p. 425-431, 2008.
- BLUM, D. et al. Cancer cachexia: a systematic literature review of items and domains associated with involuntary weight loss in cancer. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 80, n. 1, p. 114-144, 2011.
- BOWEN, T. S.; SCHULER, G.; ADAMS, V. Skeletal Muscle Wasting In Cachexia And Sarcopenia: Molecular Pathophysiology And Impact Of Exercise Training. **Journal Of Cachexia, Sarcopenia And Muscle**, v. 6, p. 197-207, 2015.
- BROSNAN, J. T.; DA SILVA, R. P.; BROSNAN, M. E. The metabolic burden of creatine synthesis. **Amino Acids**, v. 40, n. 5, p. 1325-1331, 2011.
- CAMPOS-FERRAZ, P. L. D. et al. An overview of amines as nutritional supplements to counteract cancer cachexia. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 5, n. 2, p. 105-110, 2014.
- CAMPOS-FERRAZ, P. L. et al. Exploratory studies of the potential anti-cancer effects of creatine. **Amino Acids**, v. 48, n. 8, p. 1993-2001, 2016.
- CHARTERS, Y.; GRIMBLE, R. F. Effect of recombinant human tumour necrosis factor alpha on protein synthesis in liver, skeletal muscle and skin of rats. **Biochemical Journal**, v. 258, n. 2, p. 493-497, 1989.
- COSTELLI, P.; BACCINO, F. M. Mechanisms of skeletal muscle depletion in wasting syndromes: role of ATP-ubiquitin-dependent proteolysis. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, v. 6, p. 407-412, 2003.
- DELDICQUE, L. et al. Creatine enhances differentiation of myogenic C2C12 cells by activating both p38 and Akt/PKB pathways. **American Journal of Physiology-Cell**, v.293, p.1263-1271, 2007.

- DEMINICE, R. et al. Creatine supplementation prevents the accumulation of fat in the livers of rats fed a high-fat diet. **The Journal of Nutrition**, v. 141, n. 10, p. 1799-1804, 2011.
- DEMINICE, R. et al. Creatine supplementation prevents hyperhomocysteinemia, oxidative stress and cancer-induced cachexia progression in Walker- 256 tumor- bearing rats. **Amino Acids**, v. 48, n. 8, p. 2015-2024, 2016a.
- DEMINICE, R. et al. Creatine supplementation as a possible new therapeutic approach for fatty liver disease: early findings. **Amino Acids**, v. 48, n. 8, p. 1983-1991, 2016b.
- DE SAEDELEER, M.; MARECHAL, G. Chemical energy usage during isometric twitches of frog sartorius muscle intoxicated with an isomer of creatine, b-guanidinopropionate. **Pflügers Archiv: European Journal of Physiology**, v. 402, p. 185-189, 1984.
- EVANS, W. et al. Cachexia: a new definition. **Clinical Nutrition**, Edinburgh, Scotland, v. 27, n. 6, p. 793-799, 2008.
- FEARON, K.C.H.; GLASS, D.J.; GUTTRIDGE, D.C. Cancer cachexia: Mediators, signaling, and metabolic pathways. **Cell Metabolism**, v.16, p.153-166,2012.
- FIMOGNARI, C. et al. Protective effect of creatine against RNA damage. **Mutation Research**, v. 670, n. 1-2, p. 59-67, 2009.
- FLORES, E. A. et al. Infusion of tumor necrosis factor/cachectin promotes muscle catabolism in the rat. A synergistic effect with interleukin 1. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 83, n. 5, p. 1614-1622, 1989.
- FOLKER, E. S.; BAYLIES, M. K. Nuclear Positioning in Muscle Development and Disease. **Frontiers in physiology**, v. 4, n. 363, p. 1-10, 2013.
- FONSECA, H. et al. Physical Inactivity is a Major Contributor to Ovariectomy-Induced Sarcopenia. **International Journal of Sports Medicine**, v. 33, n. 04, p. 268-278, 2012.
- FULD, J. P. et al. Creatine supplementation during pulmonary rehabilitation in chronic obstructive pulmonary disease. **Thorax**, v.60, p. 531-537,2004.
- GALVÃO D. A. et al. Changes in muscle, fat and bone mass after 36 weeks of maximal androgen blockade for prostate cancer. **British Journal of Urology International**, v.102, p.44-47, 2008.
- GOLDSPINK, D. F. et al. Muscle growth in response to mechanical stimuli. **The American Journal of Physiology**, v. 268, n. 2 Pt 1, p. E288-297, 1995.
- GOMES-MARCONDES, M. C.; TISDALE, M. J. Induction of protein catabolism and the ubiquitin-proteasome pathway by mild oxidative stress. **Cancer Letters**, v. 180, n. 1, p. 69-74, 2002.
- GONZALES-FLECHA, B.; LLESUY, S.; BOVERIS, A. Hydroperoxide initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver and muscle. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 10, p. 93-100, 1991.
- GOODMAN, M. N. Tumor necrosis factor induces skeletal muscle protein breakdown in rats. **The American Journal of Physiology**, v. 260, n. (5 Pt 1), p. E727-E730, 1991.

- GUALANO, B. et al. Exploring the therapeutic role of creatine supplementation. **Amino Acids**, v. 38, n. 1, p. 31-44, 2010.
- GUALANO, B. et al. In sickness and in health: the widespread application of creatine supplementation. **Amino Acids**, v. 43, n. 2, p. 519-529, 2012.
- GUARNIER, F. A. et al. Time course of skeletal muscle loss and oxidative stress in rats with Walker 256 solid tumor. **Muscle & Nerve**, v. 42, n. 6, p. 950-958, 2010.
- GUIDI, C. et al. Differential effect of creatine on oxidatively- injured mitochondrial and nuclear DNA. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1780, n. 1, p. 16-26, 2008.
- HARRIS, R. C.; SÖDERLUND, K.; HULTMAN, E. Elevation of creatine in resting and exercise muscle normal subjects by creatine supplementation. **Clinical Science**, v. 83, n. 3, p. 367-374, 1992.
- HONG, D.; FORSBERG, N. E. Effects of serum and insulin-like growth factor I on protein degradation and protease gene expression in rat L8 myotubes. **Journal of Animal Science**, v. 72, p. 2279-2288, 1994.
- JOHNSTON, A. P. et al. Effect of creatine supplementation during cast-induced immobilization on the preservation of muscle mass, strength, and endurance. **Journal of Strength and Conditioning Research**, v. 23, n. 1, p. 116-120, 2009.
- KHANNA, N. K.; MADAN, B. R. Studies on the anti-inflammatory activity of creatine. **Archives Internationales De Pharmacodynamie Et De Therapie**, v.231, p.340-350,1978.
- KIM, T. N.; CHOI, K. M. Sarcopenia: definition, epidemiology, and pathophysiology. **Journal of Bone Metabolism**, v. 20, p. 1-10, 2013.
- KITZENBERG, D.; COLGAN, S. P.; GLOVER, L. E. Creatine kinase in ischemic and inflammatory disorders. **Clinical and Translational Medicine**, v. 5, p. 31, 2016.
- LANDI, S. et al. Polymorphisms of glutathione-S-transferase M1 and manganese superoxide dismutase are associated with the risk of malignant pleural mesothelioma. **International Journal of Cancer**, v. 120, n. 12, p. 2739-2743, 2007.
- LAVIANO, A. et al. Therapy insight: Cancer anorexia-cachexia syndrome--when all you can eat is yourself. **Nature Clinical Practice, Oncology**, v. 2, n. 3, p. 158-165, 2005.
- LAVIANO, A. et al. Oxidative stress and wasting in cancer. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 10, n. 4, p. 449-456, 2007.
- LAWLER, J. M. et al. Direct antioxidant properties of creatine. **Biochemical Biophysical Research Communications**, v. 290, n. 1, p. 47-52, 2002.
- LENK K; SCHULER G.; ADAMS V. Skeletal muscle wasting in cachexia and sarcopenia: Molecular pathophysiology and impact of exercise training. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 1; p. 9-21, 2010.
- LI, H.; MALHOTRA, S.; KUMAR, A. Nuclear factor-kappa B signaling in skeletal muscle atrophy. **Journal of Molecular Medicine**, v. 86, n. 10, p. 1113-1126, 2008.

- LI, Y. P. et al. Skeletal muscle myocytes undergo protein loss and reactive oxygen-mediated NF-kappaB activation in response to tumor necrosis factor alpha. **FASEB Journal: Official Publication of The Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 12, n. 10, p. 871-880, 1998.
- LI, Y.; REID, M. NF-kappaB mediates the protein loss induced by TNF-alpha in differentiated skeletal muscle myotubes. **American Journal of Physiology. regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 279, n. 4, p. R1165-R1170, 2000.
- LOUGHNA, P. T.; MASON, P.; BATES, P. C. Regulation of insulin-like growth factor 1 gene expression in skeletal muscle. **Symposia of the Society for Experimental Biology**, v. 46, p. 319-330, 1992.
- LOUIS, M. et al. Creatine increases IGF-I and myogenic regulatory factor mRNA in C2C12 cells. **FEBS Letters**, v.557, p.243-247, 2004.
- MACCIÒ, A. et al. Carbocysteine: clinical experience and new perspectives in the treatment of chronic inflammatory diseases. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 10, n. 4, p. 693-703, 2009.
- MANTOVANI, G. et al. Cytokine activity in cancer-related anorexia/cachexia: role of megestrol acetate and medroxyprogesterone acetate. **Seminars in Oncology**, v. 2 Suppl 6, p. 45-52, 1998.
- MANTOVANI, G. et al. Reactive oxygen species, antioxidant mechanisms, and serum cytokine levels in cancer patients: impact of an antioxidant treatment. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology : Official Organ of The International Society for Environmental Toxicology and Cancer**, v. 22, n. 1, p. 17-28, 2003.
- MANTOVANI, G. et al. Antioxidant Therapy for the Treatment of Oxidative Stress Associated to Cancer and Cancer- Related Anorexia/Cachexia. **Bentham Science Publishers**, v. 3, n. 3, p. 184-193, 2007.
- MANTOVANI, G.; MADEDDU, C.; MACCIÒ, A. Cachexia and oxidative stress in cancer: an innovative therapeutic management. **Current Pharmaceutical Design**, v. 18, n. 31, p. 4813-4818, 2012.
- MARTIN, K. J. et al. Evaluation of creatine analogues as a new class of anticancer agents using freshly explanted human tumor cells. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 86, n.8, p. 608-613, 1994.
- MAZZINI, L. et al. Effects of creatine supplementation on exercise performance and muscular strength in amyotrophic lateral sclerosis: preliminary results. **Journal of The Neurological Sciences**, v. 191, n. 1-2, p. 139-144, 2001.
- MENEZES, L. G. et al. Creatine supplementation attenuates corticosteroid-induced muscle wasting and impairment of exercise performance in rats. **Journal of Applied Physiology**, v. 102, n. 2, p. 698-703, 2007.
- NARSALE, A. A.; CARSON, J. A. Role of interleukin-6 in cachexia: Therapeutic Implications. **Current Opinion in Supportive and Palliative Care**, v.8, p.321-327, 2014.

- NOMURA, A. et al. Anti-inflammatory activity of creatine supplementation in endothelial cells in vitro. **British Journal of Pharmacology**, v. 139, n. 4, p. 715-720, 2003.
- PAL, A.; ROY, A.; RAY, M. Creatine supplementation with methylglyoxal: a potent therapy for cancer in experimental models. **Amino Acids**, v.48, n.8, p. 2003-2013, 2016.
- PATEL, H. J.; PATEL, B. M. TNF- α and cancer cachexia: Molecular insights and clinical implications. **Life Sciences** , v. 170, p. 56-63, 2017.
- PATRA. S. et al. Progressive decrease of phosphocreatine, creatine and creatine kinase in skeletal muscle upon transformation to sarcoma. **The FEBS Journal**, v.275, n.12, p.3236-3247, 2008.
- PATRA, S. et al. A short review on creatine–creatine kinase system in relation to cancer and some experimental results on creatine as adjuvant in cancer therapy. **Amino Acids**, v.42. n.6, p.2319-2330, 2012.
- PEARLMAN, J. P.; FIELDING, R. A. Creatine Monohydrate as a Therapeutic Aid in Muscular Dystrophy. **Nutrition Reviews**, v. 64, n. 2, p. 80-88, 2006.
- PENNA, F. et al. Muscle atrophy in experimental cancer cachexia: is the IGF-1 signaling pathway involved? **International Journal of Cancer**, v. 127, n. 7, p. 1706-1717, 2009.
- PETERS, J. M.; FRANKE, W. W.; KLEINSCHMIDT, J. A. Distinct 19 S and 20 S subcomplexes of the 26 S proteasome and their distribution in the nucleus and the cytoplasm. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 10, p. 7709-7718, 1994.
- POWERS, S. K.; MORTON A.B.; AHN B.; SMUDER A.J. Redox control of skeletal muscle atrophy. **Free Radical Biology & Medicine**, v.98, p.208-217, 2016.
- POWERS, S. K. et al. Reactive oxygen species are signalling molecules for skeletal muscle adaptation. **Experimental Physiology**, v. 95, n. 1, p. 1-9, 2010.
- POWERS, T. S.; SMUDER, A. J.; JUDGE, A. R. Oxidative Stress And Disuse Muscle Atrophy: Cause Or Consequence? **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, v. 15, p. 240-245, 2012.
- RAHIMI, R.; MIRZAEI, B.; RAHMANI-NIA, F.; SALEHI, Z. Effects of creatine monohydrate supplementation on exercise-induced apoptosis in athletes: A randomized, double-blind, and placebo-controlled study. **Journal of Research in Medical Sciences**, v.20, p. 733-738, 1995.
- RAHMAN, I.; KODE, A.; BISWAS, S. K. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. **Nature Protocols**, v. 1, n. 6, p. 3159-3165, 2006.
- RANDO, T. A. Oxidative Stress and the Pathogenesis of Muscular Dystrophies. **American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation**, v. 81, n. 11, p. 175-186, 2002.
- RESZKA, E.; WASOWICZ, W.; GROMADZINSKA, J. Genetic polymorphism of xenobiotic metabolising enzymes, diet and cancer susceptibility. **The British Journal of Nutrition**, v. 96, n. 4, p. 609-619, 2006.

RIESBERG, L. A et al. Beyond muscles: The untapped potential of creatine. **International Immunopharmacology**, v.37, p.31-42, 2016.

ROLLAND, Y. et al. Cachexia versus sarcopenia. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 14, n. 1, p. 15-21, 2011.

ROY, A.; LEE, D. Dietary Creatine as a Possible Novel Treatment for Crohn's Ileitis. **American College of Gastroenterology ACG Case Reports Journal**, v. 3, n. 4, p. e173, 2016.

SACHECK, J. et al. IGF-1 stimulates muscle growth by suppressing protein breakdown and expression of atrophy-related ubiquitin ligases, atrogin-1 and MuRF1. **American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism**, v. 287, n. 4, p. E591-E601, 2004.

SAKKAS, G. K.; SCHAMBELAN, M.; MULLIGAN, K. Can the use of creatine supplementation attenuate muscle loss in cachexia and wasting? **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, v. 12, n. 6, p. 623-627, 2009.

SESTILI, P. et al. Creatine supplementation affords cytoprotection in oxidatively injured cultured mammalian cells via direct antioxidant activity. **Free Radical Biology Medicine**, v. 40, n. 5, p. 837-849, 2006.

SHANG, F.; TAYLOR, A. Ubiquitin-proteasome pathway and cellular responses to oxidative stress. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 51, n. 1, p. 5-16, 2011.

SMITH, R. N.; AGHARKAR, A. S.; GONZALES, E. B. A review of creatine supplementation in age-related diseases: more than a supplement for athletes. **F1000Research**, v. 15, n. 3, p. 1-11, 2014.

SOCIETY on Sarcopenia, Cachexia & Wasting Disorders (SCWD). **society-scwd.org**, 2009-2017. Disponível em: <<http://society-scwd.org/cachexia/>>. Acesso em: 20 Fevereiro 2017.

SPÄTE, U.; SCHULZE, P. C. Proinflammatory cytokines and skeletal muscle. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 7, n. 3, p. 265-269, 2004.

SPIRLANDELI, A. L.; DEMINICE, R.; JORDÃO, A. A. Plasma malondialdehyde as biomarker of lipid peroxidation: effects of acute exercise. **International Journal of Sports Medicine**, v. 35, n. 1, p. 14-18, 2014.

STEFANI, G. P. et al. Effects of creatine supplementation associated with resistance training on oxidative stress in different tissues of rats. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, v. 11, p. 1-9, 2014.

TAN, B. H. L.; FEARON K. C. H. Cachexia: Prevalence and impact in medicine. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, v. 11, p.400-407.

TARNOPOLSKY, M. A. et al. Creatine monohydrate enhances strength and body composition in Duchenne muscular dystrophy. **Neurology**, v. 62, n. 10, p. 1771-1777, 2004.

TAUSSKY, H. H. A microcolorimetric determination of creatine in urine by the Jaffe reaction. **Journal of Biological Chemistry**, v. 208, n. 2, p. 853-861, 1954.

TAYEK, J. A. et al. Influence of Walker-256 carcinosarcoma on muscle, tumor, and whole-body protein synthesis and growth rate in the cancer-bearing rat. **Cancer Research**, v. 46, p. 5649-5654, 1986.

THOMAS, M. J. et al. Identification of the cAMP Response Element That Controls Transcriptional Activation of the Insulin-like Growth Factor-I Gene by Prostaglandin E2 in Osteoblasts. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 36, p. 21835-21841, 1996.

TISDALE, M. J. Mechanisms of Cancer Cachexia. **Physiological Reviews**, v. 89, n. 2, p. 381-410, 2009.

TISDALE, M. J. Are tumoral factors responsible for host tissue wasting in cancer cachexia. **Future Oncology**, v. 6, n. 4, p. 503-513, 2010.

VIGANO, A. et al. Quality of life and survival prediction in terminal cancer patients: A multicenter study. **Cancer**, v.101, p.1090-1098, 2004.

WALKER, J. B. Creatine: biosynthesis, regulation, and function. **Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology**, v. 50, p. 177-242, 1979.

WALLACE, D. C. Mitochondria and cancer: Warburg addressed. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v. 70, p. 363-374, 2005.

WALLIMANN, T. et al. Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the 'phosphocreatine circuit' for cellular energy homeostasis. **The Biochemical journal**, v. 281, n. (Pt 1), p. 21-40, 1992.

WALLIMANN, T.; TOKARSKA-SCHLATTNER, M.; SCHLATTNER, U. The creatine kinase system and pleiotropic effects of creatine. **Amino Acids**, v. 40, p. 1271-1296, 2011.

WILKINSON, T. J. et al. Creatine Supplementation Improve Body Composition and Objective Physical Function in Rheumatoid Arthritis Patients? A Randomized Controlled Trial. **Arthritis Care & Research**, v.68, p.729-737, 2016.

WYSS, M.; KADDURAH-DAOUK, R. Creatine and creatinine metabolism. **Physiological Reviews**, v. 80, n. 3, p. 1107-1213, 2000.

XU, C. J. et al. Phosphocreatine-dependent glutamate uptake by synaptic vesicles. A comparison with atp-dependent glutamate uptake. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 23, p. 13435-13440, 1996.

XU, W.; LIN, D.; HUANG C. NMR-based metabolomic analysis for the effects of creatine supplementation on mouse myoblast cell line C2C12. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 49, p.617-627.

ZAMIR, O. et al. The effect of interleukin-1 α and the glucocorticoid receptor blocker RU 38486 on total and myofibrillar protein breakdown in skeletal muscle. **Journal of Surgical Research**, v. 50, n. 6, p. 579-583, 1991.

ZAMIR, O. et al. Evidence That Tumor Necrosis Factor Participates in the Regulation of Muscle Proteolysis During Sepsis. **Archives of Surgery**, v. 127, n. 2, p. 170-174, 1992.

YUAN L. et al. Muscle-specific E3 ubiquitin ligases are involved in muscle atrophy of cancer cachexia: Na in vitro and in vivo study. **Oncology Reports**, v.33, p.2261-2268.

ANEXO A - Comissão de ética no uso de animais



Universidade
Estadual de Londrina

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA N° 222/12

Londrina, 01 de outubro de 2012.

Prezado Pesquisador,

A CEUA/UUEL reunida em 11 de Setembro de 2012 avaliou o projeto de pesquisa intitulado "Suplementação de creatina, homocisteína e estresse oxidativo em ratos inoculados com tumor de Walker-256" processo CEUA/UUEL n° 17628.2012.06, pesquisa do Centro de Educação Física e Esportes desenvolvido sob sua responsabilidade. O projeto está **aprovado** para execução entendendo-se que os princípios éticos postulados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal estão respeitados.

Serão utilizados 56 ratos Wistar, machos, com peso 200-250, idade de 2 meses e procedência do Biotério Central da UEL. O projeto terá o objetivo de investigar os efeitos da implantação de tumor de Walker-256 sobre o metabolismo da Hcy e estresse oxidativo, e avaliar os efeitos da suplementação de creatina sobre os distúrbios causados pelo tumor nesse metabolismo e estresse oxidativo em ratos. Para isto será os animais serão divididos em grupos, o G1 será composto pelo grupo controle sem tumor, G2 com tumor na musculo gastrocnêmio sacrificado no quinto dia, G3 grupo com tumor sacrificado no décimo dia, G4 grupo com tumor sacrificado no décimo quarto dia. Ao final do experimento os animais serão decapitados por guilhotinas e o sangue será coletado para centrifugação, o plasma será separado e armazenado para posteriores análises, o fígado será retirado, pesado e posteriormente alíquotado. Em um segundo experimento os animais serão divididos em três grupos. Grupo controle sem tumor, grupo com tumor, grupo com tumor tratado com suplementação de creatina. A suplementação será realizada através da adição de 1% de creatina monohidratada na água de beber dos animais do grupo TCR durante 3 semanas. Ao final do período previsto os animais serão decapitados por guilhotina e o sangue coletado e centrifugado, o plasma separado e armazenado para posteriores análises. O fígado será retirado e armazenados par posteriores análises. O músculo gastrocnêmio esquerdo também será retirado e pesado para a realização do cálculo da perda de massa magra. O tumor será dissecado cuidadosamente para pesagem. O projeto está previsto para ser desenvolvido em 24 meses.

Cumprir orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/UUEL anteriormente à execução das modificações. Sem mais para o momento, subscrevo-me. Cordialmente,

Prof. Dr. Waldiceu Aparecido Verri Junior
Coordenador CEUA/UUEL

Ilmo. Sr.

Prof. Dr. Rafael Deminico

Coordenador do Projeto

Departamento de Educação Física

Centro de Educação Física e Esportiva

Com cópia para Sra Églie Maria de Sousa (Chefe da DCA/PROPPG), Prof. Luiz Carlos Juliani (Diretor do Biotério Central da UEL), e Diretor do Centro de Educação Física e Esporte.