



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

CAMILA DE SOUZA PADILHA

**CONTRIBUIÇÃO DA VIA DE SINALIZAÇÃO AKT/mTOR
NA ATENUAÇÃO DA ATROFIA MUSCULAR
ESQUELÉTICA INDUZIDA PELO TREINAMENTO
RESISTIDO EM RATOS PORTADORES DE TUMOR DE
WALKER-256**

CAMILA DE SOUZA PADILHA

**CONTRIBUIÇÃO DA VIA DE SINALIZAÇÃO AKT/MTOR
NA ATENUAÇÃO DA ATROFIA MUSCULAR
ESQUELÉTICA INDUZIDA PELO TREINAMENTO
RESISTIDO EM RATOS PORTADORES DE TUMOR DE
WALKER-256**

Tese de Doutorado apresentado ao Programa de Pós-Graduação Associado em Educação Física UEL/UEM, como requisito parcial a obtenção do título de Doutora em Educação Física.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Deminice

Londrina
2019

CAMILA DE SOUZA PADILHA

**CONTRIBUIÇÃO DA VIA DE SINALIZAÇÃO AKT/mTOR
NA ATENUAÇÃO DA ATROFIA MUSCULAR
ESQUELÉTICA INDUZIDA PELO TREINAMENTO
RESISTIDO EM RATOS PORTADORES DE TUMOR DE
WALKER-256**

Tese de Doutorado apresentado ao Programa de Pós-Graduação Associado em Educação Física UEL/UEM, como requisito parcial a obtenção do título de Doutora em Educação Física.

BANCA EXAMINADORA

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

Dra. Marília Cerqueira Leite Seelaender
Instituto de Ciências Biomédicas,
Universidade de São Paulo – ICB USP

Prof. Dr. Fábio Santos de Lira
Universidade Estadual Paulista “Julio de
Mesquita Filho” – UNESP

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

Profa. Dra. Solange de Paula Ramos
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 09 de Agosto de 2019.

PADILHA, Camila de Souza. **Contribuição da via de sinalização AKT/mTOR na atenuação da atrofia muscular esquelética induzida pelo treinamento resistido em ratos portadores de tumor de walker-256**. 2019. 77 f. Tese de Doutorado – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

RESUMO

O treinamento resistido (TR) é um clássico regulador anabólico, em que a ativação do eixo Akt/mTOR é um dos mecanismos mais conhecidos na hipertrofia muscular. Contudo, ainda é desconhecida a contribuição desse eixo na atrofia muscular. O objetivo desse estudo foi investigar a contribuição da via de sinalização Akt/mTOR na atenuação da atrofia muscular esquelética induzida pelo TR em ratos inoculados com tumor de Walker-256. Experimento 1: 37 ratos foram divididos nos seguintes grupos, controle (C, n=9), tumor (T, n=9), exercitados (E, n=9) e tumor-exercitados (TE, n=10). Os animais dos grupos T e TE foram inoculados com células de Walker-256 (4×10^7 em 500 μ l de solução salina (PBS) s.c no flanco direito) e os grupos C e E inoculados com 500 μ l de PBS. Os grupos E e TE realizaram o protocolo de TR com cargas progressivas durante 4 semanas. Experimento 2: 30 ratos foram divididos nos seguintes grupos, controle (C, n= 6), controle tratado com rapamicina (R, n=7), tumorexercitado (TE, n=8) e tumor-exercitado tratado com Rapamicina (TER, n=9). Os animais receberam rapamicina diariamente via gavagem (1mg/kg/dia em 200 μ l de água) ou placebo (200 μ l de água). Durante 4 semanas o tumor cresceu progressivamente representando $7 \pm 2\%$ do peso corporal dos animais. O tumor reduziu o ganho de peso corporal (-9,85%), promoveu anorexia (-32,3%) e atrofia do músculo FHL (P75=-24%) favorecendo a diminuição da força muscular (-11,09%) em relação ao grupo C. Embora o crescimento do tumor não tenha modificado a expressão de RNAm de mTOR, resultou em menores níveis de expressão da proteína-chave P70S6K (-26,4%) e p-P70S6K (-33,7%) em relação ao C. Entretanto, o TR atenuou a anorexia (+22,18%), porém, não melhorou o ganho de peso corporal (+6,35%) em relação ao grupo T. Além disso, o TR promoveu maior expressão da proteína P70S6K (+141%) e da p-P70S6K (+165,1%). Porém, não houve diferença na razão P70S6K/p-P70S6K (+1,13%) em relação ao grupo T. Adicionalmente, o tratamento com Rapamicina combinado com TR atenuou a atrofia no músculo FHL (P75=+9,29) independentemente da via Akt/mTOR. O tumor promoveu maiores concentrações de leucócitos circulantes (+150%), monócitos (+185,6%), TNF- α (+238%), IL-6 (+422%), TBARS (+135%), AOPP (+656%), RNAm de FBXO-32 (+204%), expressão de MAFbx/atrogin-1 (+308%) e MuRF-1 (+388%) comparado com o C. Por outro lado, o TR resultou em menores concentrações de leucócitos circulantes (-37%), monócitos (-46,5%), TNF- α (-60,5%), IL-6 (-71,3%), AOPP (-81,2%), maiores níveis circulantes de IL-10 (+224%) e a razão IL-10/ TNF- α (+78%) em relação ao grupo T. Além disso, o TR resultou em menor expressão da proteína atrogin-1 (-43,2%) com relação ao grupo T. Portanto, a via de sinalização Akt/mTOR pouco contribuiu para atenuação da atrofia do músculo FHL induzida pelo protocolo de TR em ratos inoculados com tumor de walker-256. A diminuição da degradação proteica via ativação de alvos chave do sistema ubiquitina proteossoma paralelamente a redução de citocinas pro-inflamatórias circulantes e dano oxidativo no músculo esquelético foram mais determinantes para atenuar a atrofia muscular.

Palavras-chave: Caquexia. Exercício resistido. Proteólise. Síntese proteica.

PADILHA, Camila de Souza. **AKT/mTOR signaling pathway contribution on attenuation of skeletal muscle atrophy induced by resistance training in Walker- 256 tumor-bearing rats**. 2019. 77 p. Doctorate Thesis – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

ABSTRACT

Resistance training (RT) is a classic anabolic regulator, in which Akt/mTOR pathway is one of the well-known mechanisms in muscular hypertrophy. However, the contribution of Akt/mTOR pathway in muscle atrophy is unknown. Therefore, the purpose of this study was to investigate the Akt/mTOR signaling pathway contribution on attenuation of muscle atrophy induced by RT in Walker-256 tumor-bearing rats. This study was conducted in two experiments. Experiment 1: 37 rats were allocated in following groups, control (C, n=9), tumor-bearing (T, n=9), exercised (E, n=9) and tumorbearing exercised (TE, n=10). The rats from T and TE group were inoculated with Walker-256 tumor cells (4×10^7 in 500 μ l *phosphate buffer saline* (PBS) s.c in flank) and rats from C and E were inoculated with vehicle (500 μ l PBS). Rats from E and TE performed the RT protocol in which consisted in climbing carrying progressive loads during four weeks. Experiment 2: 30 rats were allocated in following groups, treated with rapamycin (R, n=7) and tumor-bearing treated with rapamycin exercised (TER, n=9). The rats were treated with rapamycin daily via gavage (1mg/kg/day in 200 μ l water) or placebo (200 μ l water). Over four-weeks the tumor progressively grew representing $7 \pm 2\%$ of rat's body weight. The tumor reduced the body weight gain (-9.85%), promoted anorexia (-32.3%) and FHL muscle atrophy (P75= -24%) favoring muscular strength loss (-11.09%) in relation C group. Although tumor growth has not modified the RNA of mTOR, there was lower expression of protein-key P70S6K (+141%) and p-P70S6K (+165,1%) in relation C group. On the other hand, RT attenuated the anorexia (+22.18%), however, did not improve the body weight gain (+6.35%) in relation T group. Besides, RT promoted higher expression of protein-key P70S6K (+141%) and p-P70S6K (+165,1%). But, there was not difference in P70S6K/p-P70S6K ratio (+1.13%) in relation T group. In addition, the Rapamycin treatment combined with RT protocol attenuated the FHL muscle atrophy independently of Akt/mTOR pathway (P75=+9.29). The tumor promoted higher concentration of circulating leukocytes (+150%), percentage of monocytes (+185.6%), TNF-a (+238%), IL-6 (+422%), TBARS (+135%), AOPP (+656%), mRNA of FBXO-32 (+204%), atrogin-1 protein expression (+308%), MuRF-1 protein expression (+388%) in relation C group. Differently, RT protocol resulted in lower circulating leukocytes concentration (-37%), percentage of monocytes (-46.5%), TNF-a (-60.5%), IL-6 (-71.3%), AOPP (-81.2%), promoted higher IL-10 concentration (+224%) and IL-10/ TNF-a ratio (+78%) in relation T group. Furthermore, RT resulted in lower MAFbx/atrogin-1 protein expression (-43%) compared with C group. Therefore, the Akt / mTOR signaling pathway little contributes to attenuation of FHL muscle atrophy induced by RT protocol in rats inoculated with walker-256 tumor. Decreased protein degradation via activation of key-targets of the proteasome ubiquitin system in parallel with the reduction of systemic proinflammatory cytokines and oxidative damage in skeletal muscle were more determinant to attenuate muscle atrophy..

Key words: Cachexia. Resistance exercise. Proteolysis. Protein synthesis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Critérios para o diagnóstico da caquexia associada ao câncer (adaptado de Evans et al., 2008). IMC: índice de massa corporal, PCR: proteína C-reativa, IL-6: interleucina 6, Hb: hemoglobina.....	21
Figura 2 –	Classificação dos estágios da caquexia (adaptado de Fearon et al., 2011). IMC: Índice de massa corporal, OMS: Organização mundial da saúde	22
Figura 3 –	Metabolismo energético, síntese de ERO/ERN e transcrição de Inter leucinas pro-inflamatórias no tecido tumoral (adaptado de (Moreno-Sanchez et al., 2007).....	26
Figura 4 –	Mediadores induzidos pelo tumor sobre a sinalização de vias de degradação e síntese proteica no músculo esquelético na caquexia associada ao câncer (adaptado de Fearon <i>et al.</i> , 2012).....	28
Figura 5 –	Sinalização de síntese proteica muscular induzida pelo TR (adaptado de Fearon <i>et al.</i> , 2012).....	32
Figura 6 –	Escada utilizada para o protocolo de TR empregado. Parte superior de descanso (A), degraus da escada (B), tubos cônicos com carga atado a cauda do animal para controle da sobrecarga do esforço	39
Figura 7 –	Caracterização da caquexia associada ao câncer dos grupos controle não exercitado e exercitado, tumor não exercitado e exercitado. Os dados estão apresentados em media • } desvio padrão. a.b.c Diferentes letras representam diferença significativa ($P < 0,05$, ANOVA <i>two-way</i> seguido do teste de Tukey). (A) ganho de peso, (B) índice de caquexia, (C) consumo alimentar, (D) peso da gordura retroperitoneal, (E) somatória peso dos músculos.....	45
Figura 8 –	Parâmetros de atrofia e função muscular nos grupos controle (C), tumor (T), exercício (E) e tumor-exercício (TE). (A) área de secção transversa músculo FHL, (B) área de secção transversa músculo soleus, (C) carga máxima levantada, (D)	

distribuição áreas das fibras musculo FHL e (E) distribuição áreas das fibras musculosoleus. Os dados estão apresentados em media • } desvio padrão. a.b.c Diferentes letras na mesma linha representa diferença significativa ($P < 0,05$, ANOVA *one-way* seguido do pos teste de Tukey)46

Figura 9 – Gene e proteína-chave da via de sinalização Akt/mTOR nos grupos controle não exercitado e exercitado, tumor não exercitado e exercitado. (A) expressão relativa RNAm de mTOR, (B) expressão da proteína P-70S6K total, (C) p- P-70S6K fosforilada e (D) razão P-70S6K/ p-P-70S6K. Os dados estão apresentados em media • } desvio padrão. a.b.c Diferentes letras na mesma linha representa diferença significativa ($P < 0,05$, ANOVA *two-way* seguido do pos teste de Tukey)48

Figura 10 – Secção histológica representativa. AST do musculo FHL (A) dos grupos controle (C), portadores de tumor (T), exercitados com tumor (TE), tratados com rapamicina (R) e tratados com tumor com grupos rapamicina (TER). Os dados estão apresentados em media • } desvio padrão. a.b.c Diferentes letras na mesma linha representa diferença significativa ($P < 0,05$, ANOVA *one-way* seguido do pos teste de Tukey)49

Figura 11 – Mediadores pro- e anti-inflamatórios e dano oxidativo nos grupos controle não exercitado e exercitado, tumor não exercitado e exercitado. (A) No de leucocitos, (B) linfocitos, (C) monocitos, (D) TNF- α , (E) IL-6, (F) TBARS, (G) AOPP, (H) IL-10 e razão IL-10/ TNF- α (I). Os dados estão apresentados em media • } desvio padrão. a.b.c Diferentes letras na mesma linha representa diferença significativa ($P < 0,05$, ANOVA *two-way* seguido do pos teste de Tukey)51

Figura 12 – Mediadores chave do sistema ubiquitina proteassoma nos grupos controle não exercitado e exercitado, tumor não exercitado e exercitado. (A) Expressão relativa de RNAm dos genes FBXO-32, (B) expressão da proteína atrogin-1,

(C) expressão da proteína MuRF-1. Os dados estão apresentados em media \pm desvio padrão. a.b.c Diferentes letras na mesma linha representa diferença significativa ($P < 0,05$, ANOVA *two-way* seguido do pos teste de Tukey).52

Figura 14 – Atenuação da atrofia muscular via sinalização de degradação proteica apos programa de TR através da redução dos mediadores pro-inflamatórios54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Frequência da caquexia no câncer.....	23
-------------------	---------------------------------------	----

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	17
2.	REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1	CAQUEXIA ASSOCIADA AO CANCER: DEFINICAO, CLASSIFICACAO E EPIDEMIOLOGIA	20
2.2	MECANISMOS ENVOLVIDOS NA ATROFIA MUSCULAR NA CAQUEXIA ASSOCIADA AO CANCER	24
2.3	TREINAMENTO RESISTIDO COMO ESTRATEGIA PARA AMENIZAR A CAQUEXIA ASSOCIADA AO CANCER	29
3.	JUSTIFICATIVA	33
4.	HIPÓTESE	34
5.	OBJETIVOS	35
5.1	OBJETIVO GERAL	35
5.2	OBJETIVOS ESPECIFICOS	35
6.	MÉTODOS	36
6.1	ANIMAIS E TRATAMENTO	36
6.2	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	36
6.2.1.	Experimento 1: Efeito do TR sobre a Caquexia do Cancer	36
6.2.2.	Experimento 2: O Papel da via de Sinalizacao Akt/mTOR no Efeito Anti-Atrofico do TR	37
6.3	INOCULACAO DO TUMOR DE WALKER-256	37
6.4	TESTE DE CARGA MAXIMA E PROTOCOLO DE TR	38
6.5	EUTANASIA, COLETA E PREPARO DOS TECIDOS	39
6.6	ANALISE HISTOLOGICA	40
6.7	ANALISE DE CITOCINAS, CONTAGEM DE CELULAS MONONUCLEARES PERIFERICA E ESTRESSE OXIDATIVO	40
6.8	DETERMINACAO DA EXPRESSAO DE RNAM POR PCR EM TEMPO REAL	41
6.9	ANALISE DE WESTERN BLOTTING	42
6.10	ESTATISTICA	43
7.	RESULTADOS	43
7.1	PROTOCOLO DE TR ATENUA O DESENVOLVIMENTO DA CAQUEXIA INDUZIDA PELO TUMOR DE WALKER-256	43

7.2	EXPRESSAO DE GENE E PROTEINA-CHAVE DA VIA DE SINALIZACAO AKT/MTOR NA ATROFIA MUSCULAR	47
7.3	TR ATENUA A ATROFIA MUSCULAR INDEPENDENTEMENTE DA VIA DE SINALIZACAO AKT/MTOR NA CAQUEXIA ASSOCIADA AO CANCER	49
7.4	TR ATENUA A ATROFIA MUSCULAR POR MEIO DA DIMINUICAO DA INFLAMACAO SISTEMICA, DANO OXIDATIVO E PROTEINAS-CHAVE DA VIA UBIQUITINA PROTEASSOMA	50
8.	DISCUSSÃO	53
	CONCLUSÃO	58
	REFERÊNCIAS	59
	APÊNCIDES	70
	APÊNDICE A	71
	COMITE DE ETICA EM EXPERIMENTACAO ANIMAL	71
	ANEXOS	73
	ANEXO A	74
	ARTIGO 1 ACEITO PARA PUBLICACAO: EFEITO DO PROTOCOLO DE TR SOBRE OS PARAMETROS TUMORAIS	74
	ANEXO B	75
	ARTIGO 2 EM PREPARACAO: EFEITO DO PROTOCOLO DE TR NA ATENUACAO DA ATROFIA MUSCULAR	75

1. INTRODUÇÃO

A caquexia no câncer é uma síndrome multifatorial complexa caracterizada pela perda involuntária e progressiva do peso corporal refletida principalmente na atrofia muscular, podendo ou não resultar na perda do tecido adiposo em um curto período de tempo (aproximadamente 6-12 meses) e não é revertida pela terapia nutricional convencional (FEARON *et al.*, 2013). Aproximadamente metade dos pacientes com câncer desenvolvem a síndrome da caquexia, alcançando cerca de 80% dos pacientes com câncer em estágio avançado e tipos específicos, como por exemplo, o câncer no trato gastrointestinal (TISDALE, 2010b). Cerca de 20% dos pacientes com caquexia vão à óbito e cerca de 50% dos pacientes morrem sem serem diagnosticados com caquexia (VON HAEHLING e ANKER, 2014). Anualmente, a duração média da permanência em internações hospitalares atribuídas à caquexia é de 6 dias, comparada com 3 dias para internações de pacientes não caquéticos (ARTHUR *et al.*, 2014). Embora a caquexia no câncer seja menos prevalente na população geral comparada com doenças comuns, essa síndrome ainda é negligenciada (ANKER *et al.*, 2019).

A atrofia muscular é um dos principais componentes da caquexia associada ao câncer, levando ao progressivo prejuízo da capacidade motora (TAN e FEARON, 2008), comprometendo a efetividade do tratamento refletindo em mau prognóstico (ARGILÉS *et al.*, 2013; DI SEBASTIANO *et al.*, 2013). Estudos demonstram que a atrofia muscular resulta do desbalanço entre síntese e degradação de proteínas (CSIBI *et al.*, 2008; BALKWILL e MANTOVANI, 2012). O aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias e espécies reativas do oxigênio e nitrogênio (ERO/ERN) favorecem o catabolismo muscular por ativarem o sistema ubiquitina proteassoma, especialmente pelo mediador *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer*

of activated B cells (NF- κ B) (ARGILÉS *et al.*, 2014). Esse fator seria responsável por transcrever genes envolvidos no catabolismo muscular, dentre eles a *F-box 32 protein* (FBXO-32) que contribui significativamente para o aumento da atividade do sistema ubiquitina proteassoma (GOMES *et al.*, 2001; YUAN *et al.*, 2015). O sistema ubiquitina proteassoma exige alta demanda de ATP para sustentar sua atividade, interferindo diretamente na sinalização da via protein kinase B (AKT)/mammalian target of rapamycin (mTOR), mediada pela ativação da *adenosine monophosphate-activated protein kinase* (AMPK), um importante sensor energético que quando ativado, inibe vias anabólicas para restituição da disponibilidade de aminoácidos (HARDIE, 2004). Portanto, no estado de atrofia muscular a inibição da mTOR causada pela falta de aminoácidos disponíveis é compreensível, uma vez que, uma das principais funções do complexo mTOR é realizar a tradução do RNA mensageiro (RNAm) (JIANG *et al.*, 2008; THOREEN *et al.*, 2009). A interação da via proteolítica na regulação de síntese proteica é indicada pela atrogin-1, por meio da sua ubiquitinação, degradando o mediador *eukaryotic translation initiation factor 3 subunit f* (eIF3f), impedindo dessa forma a fosforilação da *ribosomal protein S6 beta-1* (P70S6K) pela mTOR (LAGIRAND-CANTALOUBE *et al.*, 2008). Portanto, estratégias que estimulam a ativação da via de sinalização Akt/mTOR são importantes para promover hipertrofia muscular.

O treinamento resistido (TR) é vastamente conhecido por favorecer a saúde e bem-estar e melhora da funcionalidade muscular (ACSM, 2009). De fato, o TR é uma estratégia promissora não farmacológica, desempenhando um papel anti-inflamatório e antioxidante (ACSM, 2009; PADILHA *et al.*, 2017a). Além disso, é responsável por induzir o aumento da síntese de proteína miofibrilar e aumentar as concentrações de proteínas contráteis no músculo esquelético (DAMAS *et al.*, 2015;

DAMAS *et al.*, 2016). A aplicação contínua de sobrecarga muscular ativa fatores de transcrição e a expressão de várias proteínas sinalizadoras responsáveis pela regeneração e do crescimento muscular (SAKAMOTO e GOODYEAR, 2002). Nesse cenário, o TR aumenta as concentrações de *insulin-like growth factor 1* (IGF-1) (CASSANO *et al.*, 2009), ativando a via de sinalização *phosphatidylinositide 3-kinase* (PI3K)/Akt/mTOR, uma importante cascata na regulação de taxa de síntese de proteína durante o crescimento muscular (HOLZ *et al.*, 2005).

A mTOR está ligada à duas subunidades catalítica regulatórias, sendo elas, *mammalian lethal with sec-13 protein 8* (mLST8) e *proline-rich Akt substrate 40 kDa* (PRAS40), essas apresentam funções distintas na sinalização intracelular (CUNNINGHAM *et al.*, 2007). A sinalização da via PI3K/Akt/mTOR participa do processo de tradução, biogênese ribossomal, autofagia, metabolismo da glicose e na resposta celular à hipóxia (VANDER HAAR *et al.*, 2007; MIYAZAKI *et al.*, 2008). Estudos demonstram que o TR aumenta a atividade do complexo mTOR, ativa a P70S6K e a proteína ligadora *eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1* (4E-BP1). A ativação dessas proteínas-chave abaixo da mTOR representa de fato o aumento da síntese de proteína induzida pelo TR (HARA *et al.*, 2002; DAS NEVES *et al.*, 2016; KHAMOUI *et al.*, 2016; OGASAWARA *et al.*, 2016). Nesse sentido, ainda há informações limitantes na literatura sobre os mecanismos envolvidos na atenuação da atrofia muscular induzida pelo TR, em especial, sobre a contribuição da via anabólica Akt/mTOR e sob estímulos catabólicos na caquexia associada ao câncer.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CAQUEXIA ASSOCIADA AO CÂNCER: DEFINIÇÃO, CLASSIFICAÇÃO E EPIDEMIOLOGIA

Etimologicamente, o termo caquexia é de origem grega, derivada da palavra “*kakos*” (má) e “*hexis*” (condição), significando a má condição do paciente (DOEHNER e ANKER, 2002).

Embora a síndrome da caquexia tenha sido descrita há cerca de dois mil anos, um dos maiores desafios no que se refere tanto a pesquisa experimental quanto à clínica, é a dificuldade em diagnosticar essa síndrome, dessa forma, essa síndrome é raramente tratada (LOK, 2015). Atualmente, as proposições existentes apontam para uma interpretação mais consensual da síndrome da caquexia, a dificuldade em estabelecer uma definição e etiologia, inviabiliza o tratamento dos pacientes, bem como o desenvolvimento e aprovação de novos agentes terapêuticos (EVANS *et al.*, 2008; FEARON *et al.*, 2011). As proposições internacionais e o consenso brasileiro de caquexia/anorexia em cuidados paliativos estabelecem que a perda de peso corporal, índice de massa corporal (IMC) e avaliação da massa muscular esquelética compõem os critérios base para diagnóstico da síndrome (EVANS *et al.*, 2008; FEARON *et al.*, 2011). Somado aos critérios base, redução da ingestão alimentar, indicadores de catabolismo muscular e baixa força muscular, bem como indicadores metabólicos, sociais e psicológicos compõem a totalidade para o diagnóstico da caquexia (Figura 1). Uma vez que os pacientes são diagnosticados com a síndrome, os mesmos são classificados nos seguintes estágios: pré-caquexia, caquexia ou caquexia refratária, conforme foi proposto por FEARON *et al.*, (2011). Ainda, é importante ressaltar que os pacientes podem ou não atravessar por todos os estágios da caquexia, **(Figura 2)**.

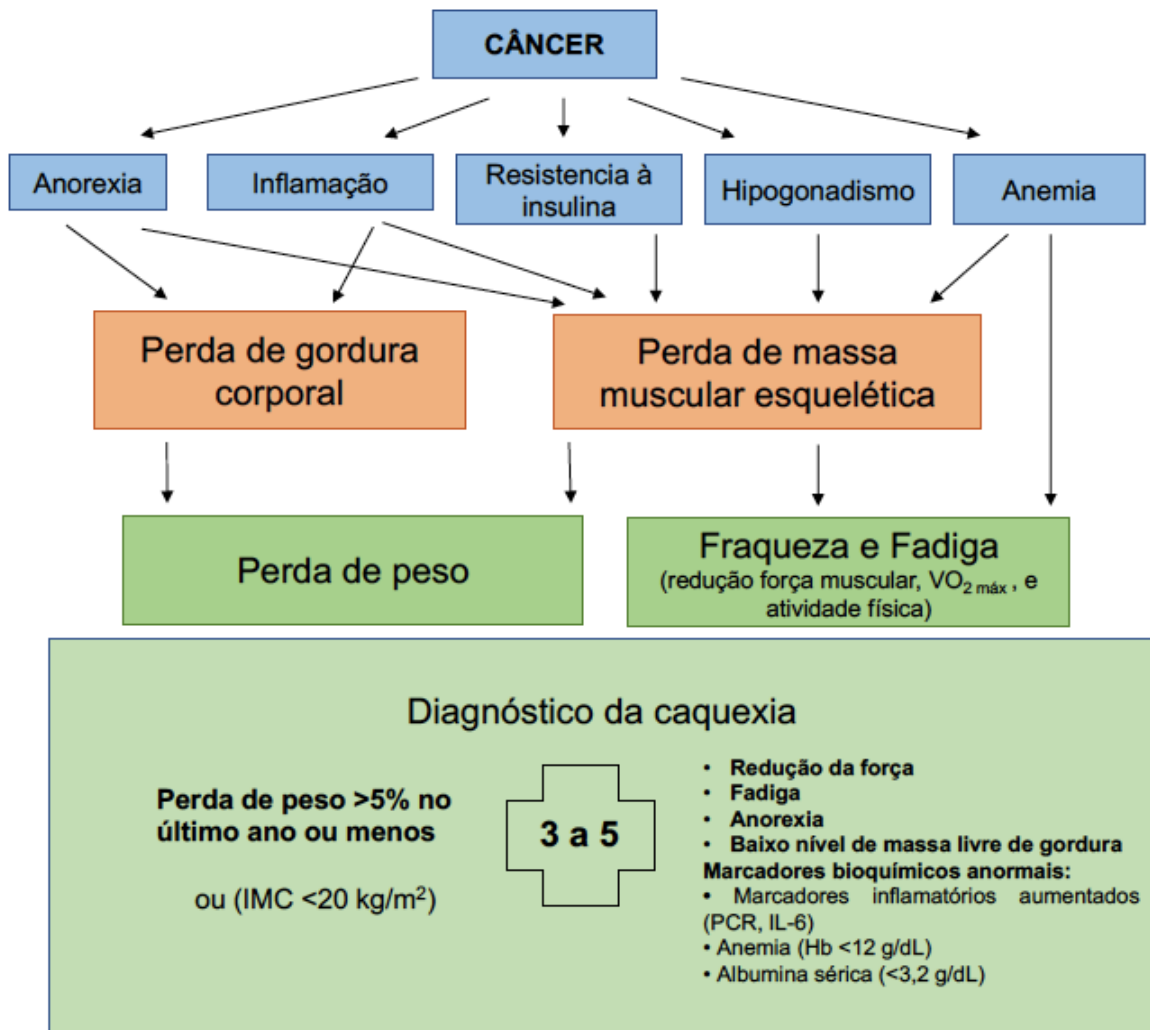


Figura 1. Critérios para o diagnóstico da caquexia associada ao câncer (adaptado de EVANS *et al.*, 2008). IMC: índice de massa corporal, PCR: proteína C-reativa, IL-6: interleucina 6, Hb: hemoglobina.

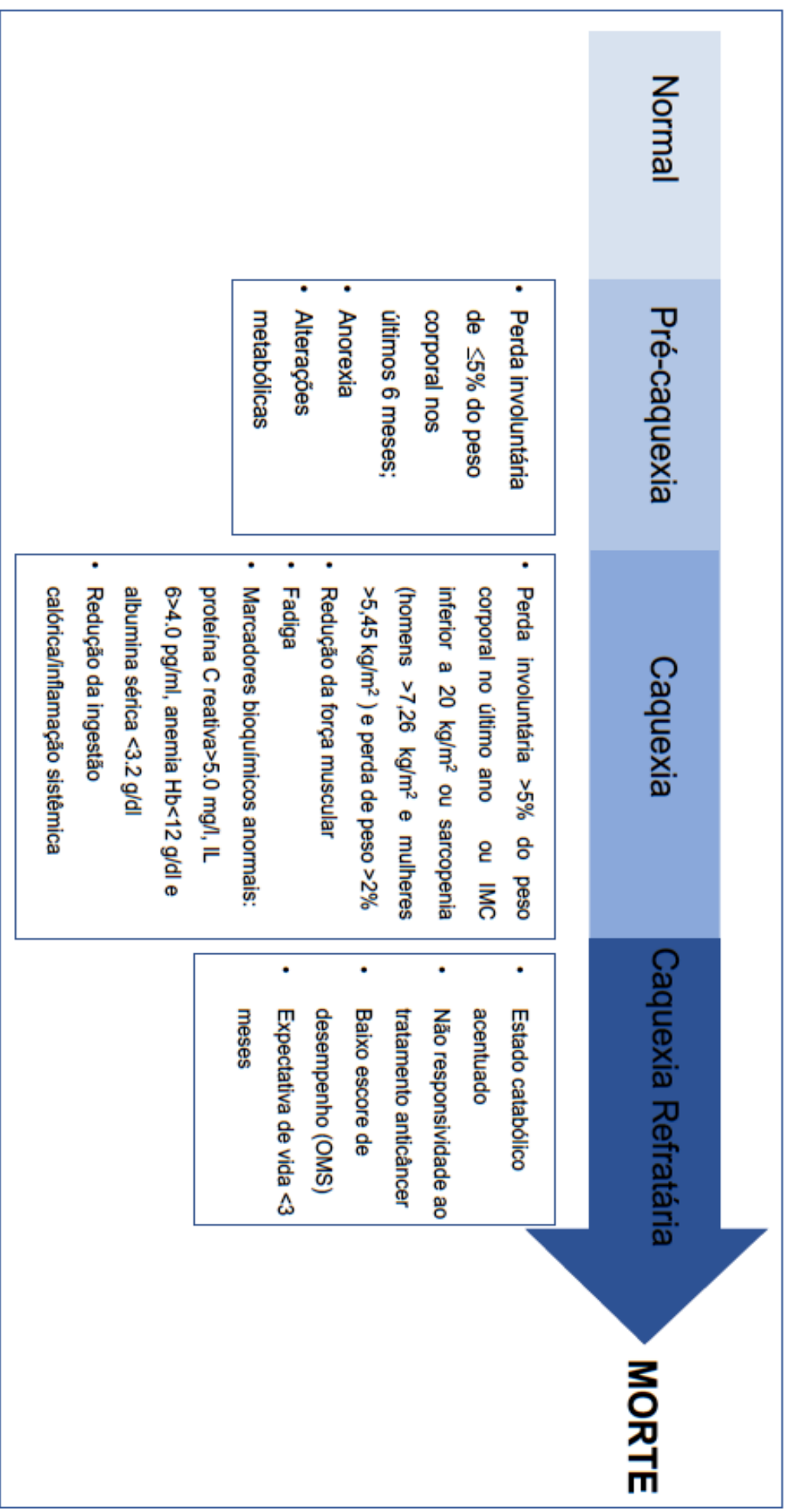


Figura 2. Classificação dos estágios da caquexia (adaptado de FEARON *et al.*, 2011). IMC: Índice de massa corporal, OMS: Organização mundial da saúde.

Diante das dificuldades em diagnosticar a síndrome da caquexia, estimar precisamente sua prevalência tem sido uma tarefa complexa (VON HAEHLING e ANKER, 2014). Discute-se, atualmente, que a síndrome da caquexia acomete cerca de 80% dos pacientes com câncer em estágio avançado, sendo um forte contribuinte, ou mesmo causa de morte, em cerca de 25% dos pacientes diagnosticados com a síndrome. Ainda mais alarmante, cerca de 50% dos pacientes morrem sem diagnóstico (VON HAEHLING e ANKER, 2014; ANKER *et al.*, 2019). O desenvolvimento da caquexia no câncer do trato gastrointestinal e pâncreas são os mais prevalentes, correspondendo a cerca de 80% dos pacientes, enquanto que, 60% dos pacientes com câncer no pulmão, próstata e cólon desenvolvem a caquexia, e 40% das mulheres com câncer de mama e pacientes com leucemia desenvolvem a síndrome (**Tabela 1**) (TAN e FEARON, 2008; FARKAS *et al.*, 2013). Dessa forma, uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na caquexia associada ao câncer possibilita elaborar estratégias para amenizar os efeitos deletérios nos pacientes.

Tabela 1: Frequência da caquexia no câncer e pacientes em risco de desenvolver caquexia no câncer.

Tipo de câncer (N, taxa de sobrevida em 5 anos)	Prevalência de caquexia no câncer de pacientes em risco (%)	Pacientes em risco de desenvolver caquexia no câncer (%)
Risco muito alto (0-30%)		
Fígado (1.678, 19%)	50,1	90
Pâncreas (755, 9%)	45,6	90
Pulmão (4.929, 20%)	37,2	80
Risco Alto (31-66%)		
Cabeça e pescoço (856, 66%)	42,3	70
Estômago (2.638, 31%)	33,3	70
Colorretal (3.716, 66%)	31,8	50
Risco Médio (67-90%)		
Endométrio (1.280, 83%)	32,2	40
Rim (1.549, 75%)	31,6	40
Linfoma Não-Hodgkin (1.220, 73%)	28,4	30
Bexiga (3.329, 78%)	25,2	30
Risco Baixo (91-100%)		
Tireoide (534, 98%)	39,9	30
Mama (4.565, 91%)	23,5	30
Pele melanoma (<500, 94%)	22,1	20
Próstata (3.501, 99%)	15,3	20

Nota: Frequência da caquexia estimada em 31.047 pacientes nos Estados Unidos e União Europeia (adaptado de ANKER *et al.*, 2019).

2.2 MECANISMOS ENVOLVIDOS NA ATROFIA MUSCULAR NA CAQUEXIA ASSOCIADA AO CÂNCER

Estudos clínicos e experimentais realizados até o momento, mostram que a perda de peso corporal, atrofia muscular esquelética, redução da ingestão alimentar e o aumento do gasto calórico são resultados inerentes à complexa e sofisticada interação entre tumor e o hospedeiro (DI SEBASTIANO *et al.*, 2013; DE

VOS-GEELEN *et al.*, 2014; BLAUWHOFF-BUSKERMOLEN *et al.*, 2016; CRAWFORD, 2016; ESCAMILLA e JARRETT, 2016; DE MORAIS *et al.*, 2017). O microambiente tumoral é caracterizado por componentes celulares distintos no interior de uma matriz extracelular, disponibilizando nutrientes e oxigênio para o crescimento do tumor (HUI e CHEN, 2015). Os componentes intratumorais propiciam condições favoráveis que modificam o fenótipo de células imunológicas, especialmente de macrófagos e dos linfócitos T (KIM e BAE, 2016). O microambiente tumoral determina a diferenciação e polarização dos macrófagos e dos linfócitos T, que é impulsionada também por diferentes mediadores de crescimento, por exemplo, *epidermal growth factor* (EGF), *macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF) e *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) (LIN e KARIN, 2007; DEHNE *et al.*, 2017) e ativação do *hypoxia-inducible factor 1 alpha* (HIF-1 α) (MEKHAIL *et al.*, 2004) e exposição ao lactato (GRIVENNIKOV *et al.*, 2010; COLEGIO *et al.*, 2014; KIM e BAE, 2016). (de Matos *et al.*, 2016)

A severidade com que o crescimento tumoral ocorre resultará em diferentes respostas inflamatória e na desregulação energética do hospedeiro (CAHLIN *et al.*, 2000; GRIVENNIKOV *et al.*, 2010). Em pacientes com câncer avançado, a massa do tumor pode alcançar um peso de ~0,75 kg, o consumo de energia pelo tumor resulta num aumento do gasto energético de repouso de ~17.700 kcal em um período de 3 meses, contribuindo assim substancialmente para a perda de peso associada à caquexia (FEARON *et al.*, 2013). A resposta inflamatória desencadeada pelo desenvolvimento do tumor faz parte da defesa do hospedeiro, cujo objetivo é combater o crescimento do tumor (BALKWILL e MANTOVANI, 2012). Contudo, fatores liberados pelo tumor estabelecem no hospedeiro respostas inflamatórias persistentes, denominado de inflamação crônica de baixo grau

(GRIVENNIKOV *et al.*, 2010; LAVIANO *et al.*, 2015). Dessa forma, o estado inflamatório sistêmico de baixo grau é o componente central do catabolismo muscular observada em pacientes com caquexia (SEELAENDER *et al.*, 2012; LAVIANO *et al.*, 2015; WANG e YE, 2015) (**Figura 3**).

A elevação de citocinas circulantes que medeia a inflamação promove alterações em diversos órgãos, afetando o sistema nervoso central, intestino, músculo esquelético, coração, fígado, pâncreas, tecido adiposo e rins (ARGILÉS *et al.*, 2015). No músculo esquelético, a sinalização de citocinas de caráter pró inflamatória acentuam a ativação de vias catabólicas já ativadas durante caquexia (ARGILÉS *et al.*, 2015). Um estudo publicado pelo nosso grupo de pesquisa destaca o aspecto multifatorial da síndrome da caquexia, apontando que a combinação de citocinas e outros mediadores pró-inflamatórios contribuíram para promover o fenótipo característico da síndrome (FRAJACOMO *et al.*, 2016). Nesse cenário, o músculo esquelético é um dos tecidos que mais é afetado pela síndrome da caquexia (ARGILÉS *et al.*, 2005).

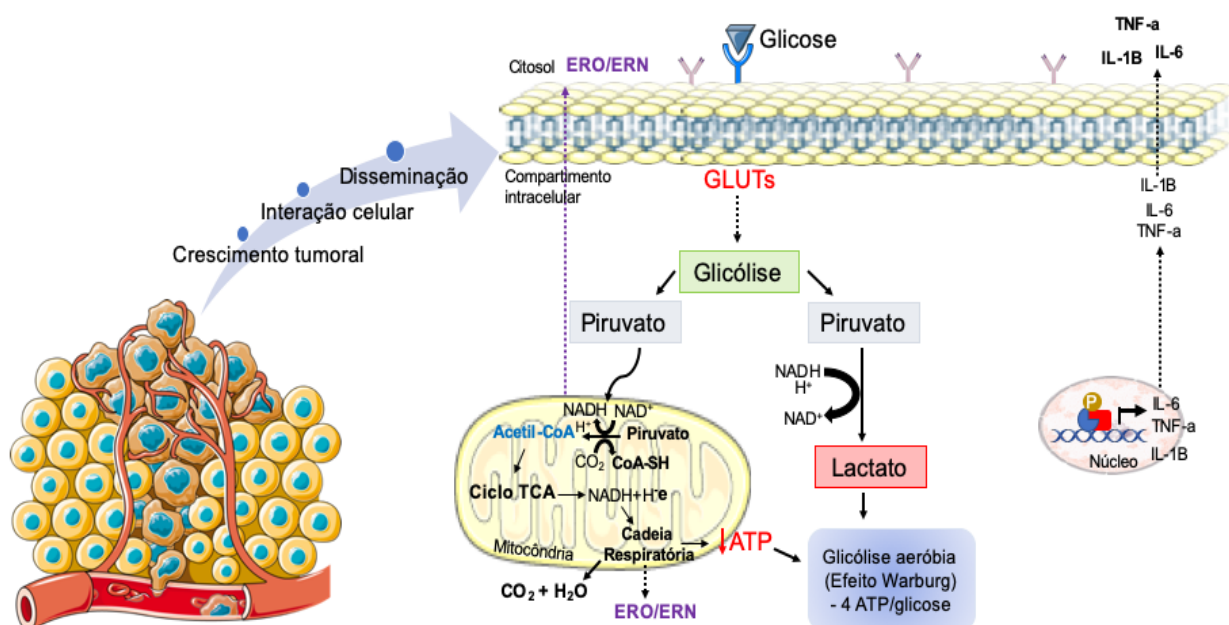


Figura 3: Metabolismo energético, síntese de ERO/ERN e transcrição de citocinas pró-inflamatórias no tecido tumoral (adaptado de MORENO-SANCHEZ *et al.*, 2007).

Uma importante característica do músculo esquelético é sua capacidade plástica de regular suas propriedades funcionais, estruturais e metabólicas em diferentes demandas fisiológicas (TEN BROEK *et al.*, 2010; BRAUN e GAUTEL, 2011). Especificamente, a manutenção do músculo esquelético, crescimento e reparo dependem de diferentes mediadores que orquestram as complexas vias de síntese e degradação de proteínas (LEGER *et al.*, 2006; BRAUN e GAUTEL, 2011; BERDEAUX e STEWART, 2012). A produção exacerbada de ERO/ERN associada tanto a inflamação sistêmica quanto local, são gatilhos para ativação de vias de sinalização para degradação de proteínas promovendo atrofia muscular (REID *et al.*, 2005).

A atividade aumentada do sistema ubiquitina proteassoma parece desempenhar o papel mais importante para induzir a atrofia muscular na caquexia associada ao câncer (LECKER *et al.*, 1999; LECKER *et al.*, 2006). O músculo esquelético é facilmente suscetível a fatores caquéticos, por exemplo, citocinas pró-inflamatórias, com o direcionamento altamente seletivo de proteínas específicas do músculo esquelético (TISDALE, 2001; TISDALE, 2009; FANZANI *et al.*, 2012). Diferentes enzimas exercem papéis singulares no processo de ubiquitinação, são elas, enzima de ativação da ubiquitina (E1), enzima conjugadora de ubiquitina (E2) e enzima ubiquitina ligase (E3). Após a ativação da ubiquitina pela E1, a ubiquitina ativada é transferida pela E2 e posteriormente fornecida para a E3 ligar covalentemente à ubiquitina aos grupos ϵ -amino dos resíduos de lisina das proteínas alvo, e então a mesma é endereçada ao proteassoma 26S para sua degradação (EBNER *et al.*, 2017). Modelos de tumores mais agressivos, por exemplo, carcinoma de cólon-26, mostrou maior redução seletiva da miosina de cadeia pesada comparada com outras proteínas (ACHARYYA *et al.*, 2004). Em pacientes com câncer no estômago

diagnosticados com caquexia, por meio de biópsias musculares foi demonstrado a expressão elevada de RNAm de ubiquitina e as subunidades do proteassoma 20S, degradando proteínas oxidadas sem que sejam previamente marcadas pela ubiquitinação (WILLIAMS *et al.*, 1999), além da atividade aumentada do proteassoma muscular (BOSSOLA *et al.*, 2003). A atividade elevada da via ubiquitina proteassoma na caquexia parece ser mediada pela ativação dos fatores de transcrição *forkhead family of proteins* (FoxO) e NF- κ B, que induzem a ativação dos principais atrogenes *muscle RING-finger protein-1* (MuRF-1) e *muscle atrophy F-box* (MAFbx). Esta sinalização catabólica suprime a via PI3K/Akt e, portanto, diminui a síntese proteica (DU *et al.*, 2004) (**Figura 4**). Nesse cenário, o catabolismo gradual da massa muscular esquelética reflete em mau prognóstico do câncer, reforçando a importância de novas estratégias para impedir tal catabolismo.

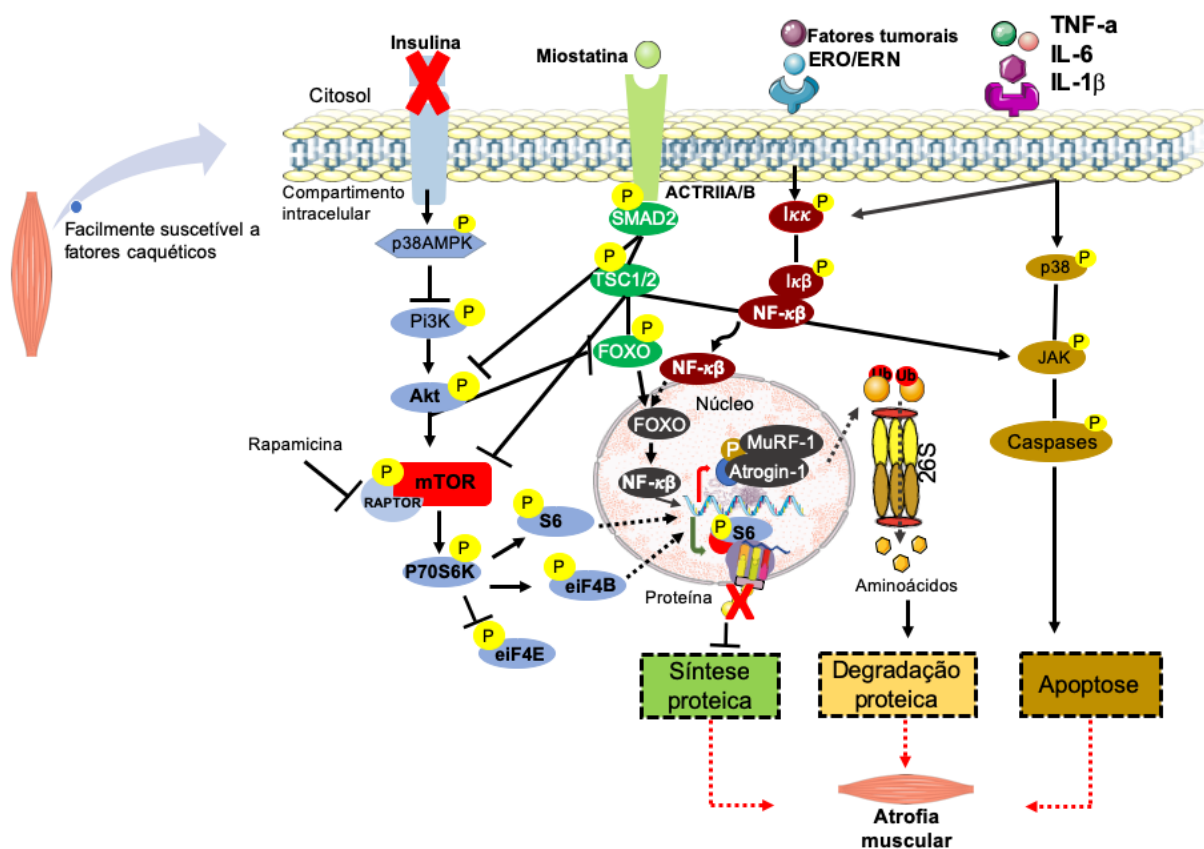


Figura 4: Mediadores catabólicos sobre a sinalização de vias de degradação e síntese proteica no músculo esquelético na caquexia (adaptado de FEARON *et al.*, 2012).

2.3 TREINAMENTO RESISTIDO COMO ESTRATÉGIA PARA AMENIZAR A CAQUEXIA ASSOCIADA AO CÂNCER

As propostas convencionais farmacológicas e/ou nutricionais não refletem ou atendem as expectativas no cenário clínico (ARGILÉS *et al.*, 2010), uma vez que o tratamento farmacológico não reverte o quadro da caquexia (PENNA *et al.*, 2010; FEARON *et al.*, 2013). Embora as estratégias nutricionais revelem efeitos promissores, os resultados parecem não ser resolutivos (DEMINICE *et al.*, 2016; PETRUZZELLI e WAGNER, 2016; CELLA *et al.*, 2019). Foi reportado previamente que, no primeiro ano de terapia hormonal após diagnóstico de câncer de próstata os pacientes apresentam um declínio substancial de massa muscular esquelética (~1,4kg) (GALVÃO *et al.*, 2008). Neste sentido, orientações práticas para amenizar ou reverter a perda da massa muscular na caquexia associada ao câncer são escassas, principalmente em razão da complexidade da síndrome (BODDAERT *et al.*, 2006; TAZI e ERRIHANI, 2010).

Dentre as estratégias não farmacológicas para amenizar a atrofia muscular, o TR, em particular, tem sido cada vez mais estudado (DONATTO *et al.*, 2013; DAS NEVES *et al.*, 2016; PADILHA *et al.*, 2017a). O TR é conhecido por promover saúde e bem estar, apresentando impactos favoráveis sobre o fenótipo muscular, e é recomendado para pacientes em tratamento e sobreviventes do câncer (COURNEYA *et al.*, 2008; ACSM, 2009; SCHMITZ *et al.*, 2010; COURNEYA, 2017). O aumento da massa muscular esquelética pode ser alcançada por meio do TR, um clássico estimulador da síntese de proteína (CHESLEY *et al.*, 1992; DAMAS *et al.*, 2015). O TR induz períodos cumulativos de balanço positivo de proteína, ou seja, a síntese supera a degradação de proteína (MACDOUGALL *et al.*, 1995), proporcionando deste modo, um cenário favorável para atenuar a atrofia muscular associada ao câncer (**Figura 5**). Em uma revisão sistemática com meta-análise

publicada por nosso grupo de pesquisa, a análise de 14 estudos elegíveis apontou que o TR foi efetivo para aumentar a força de membros inferiores e prevenir a atrofia muscular em pacientes durante o tratamento neoadjuvante e adjuvante independente do tipo da terapia (ex: quimioterapia, radioterapia, ou hormonal combinado com quimio/radioterapia), e conseqüentemente diminuiu os efeitos colaterais induzidos pelas intervenções medicamentosas, melhorando os desfechos de saúde desses pacientes (PADILHA *et al.*, 2017b). Adicionalmente, em um estudo de coorte, onde foram avaliados 8.762 pacientes com câncer, foi observada uma associação inversa entre força, massa muscular e mortalidade (RUIZ *et al.*, 2009). Portanto, o TR atenua a perda de força e massa muscular em pacientes com câncer aumentando dessa forma a qualidade e expectativa de vida.

Com relação aos estudos pré clínicos, chama a atenção para grande variabilidade de modelos, protocolos e tempo de duração dos programas de TR empregados durante a caquexia no câncer. Em um estudo conduzido por KHAMOUI *et al.*, (2016), os animais realizaram três sessões de TR com cargas progressivas durante oito semanas e após esse período foram inoculados com células tumorais de carcinoma cólon-26. Após a inoculação do tumor, os animais continuaram com o TR por três semanas adicionais. Os resultados demonstraram que TR promoveu aumento sutil da massa muscular esquelética e reduziu mediadores chave para degradação de proteína (atrogin-1 e MuRF-1). Embora não apresente diferença estatística, foi observado uma tendência para aumento de mediadores chave para síntese de proteína (IGF-1, Akt-mTOR) (KHAMOUI *et al.*, 2016). Além disso, de acordo com o estudo publicado anteriormente por nosso grupo, os animais realizaram três sessões de TR com cargas progressivas previamente ao desenvolvimento da caquexia induzida pelo tumor de Walker-256 (PADILHA *et al.*, 2017a). Após seis semanas de

TR e 12 dias de desenvolvimento do tumor combinado com TR, foi observado aumento no ganho de peso corporal, diminuição da atrofia muscular mediada principalmente pela diminuição dos marcadores inflamatórios e ERO (PADILHA *et al.*, 2017a). Dessa forma, o TR apresenta diversos efeitos preventivos no desenvolvimento da caquexia associada ao câncer.

O crescente número de estudos investigando os efeitos terapêuticos do TR na caquexia associada ao câncer vem chamando atenção de pesquisadores. Em um estudo recentemente publicado por nosso grupo de pesquisa, foi investigado o efeito terapêutico de quatro semanas de TR com cargas progressivas sobre os parâmetros de crescimento de dois modelos de tumores sólidos (tumor de Walker-256 e Ehrlich) em ratos e camundongos respectivamente. Após quatro semanas de TR, nossos resultados demonstraram que o TR pode atenuar o crescimento tumoral e os parâmetros de agressividade, tais como diminuição do grau do tumor, área tumoral viável e proliferação de células tumorais de ambos os modelos sólidos de adenocarcinomas. Além disso, nossos resultados indicaram um papel parcial de TR para induzir a vascularização do tumor. Embora o TR seja capaz de diminuir o crescimento do tumor e a agressividade, não aumentou a expectativa de vida dos animais (PADILHA *et al.*, 2019). Ainda, DAS NEVES *et al.*, (2016) investigaram o efeito terapêutico do protocolo de TR durante o desenvolvimento da caquexia induzida pelo tumor de Walker-256. Os autores demonstraram que a perda da capacidade em gerar força é diretamente associada à mortalidade. Contudo, o curto período de TR promoveu modestos efeitos durante a progressão da caquexia, sobretudo nos mediadores de síntese e degradação de proteínas (DAS NEVES *et al.*, 2016). Apesar de poucos estudos experimentais, estes apresentam resultados consistentes que demonstram que o TR pode diminuir a progressão tumoral (~10%), aumentando a

atividade de macrófagos e linfócitos, contribuindo para aumento de fagocitose e a manutenção do conteúdo de glicogênio muscular (BACURAU *et al.*, 2007; DE LIMA *et al.*, 2008; DE LIMA *et al.*, 2011; DONATTO *et al.*, 2013). Ainda não há estudos que demonstrem a contribuição da sinalização para síntese de proteína via Akt-mTOR promovida pelo TR durante o desenvolvimento da caquexia associada ao câncer.

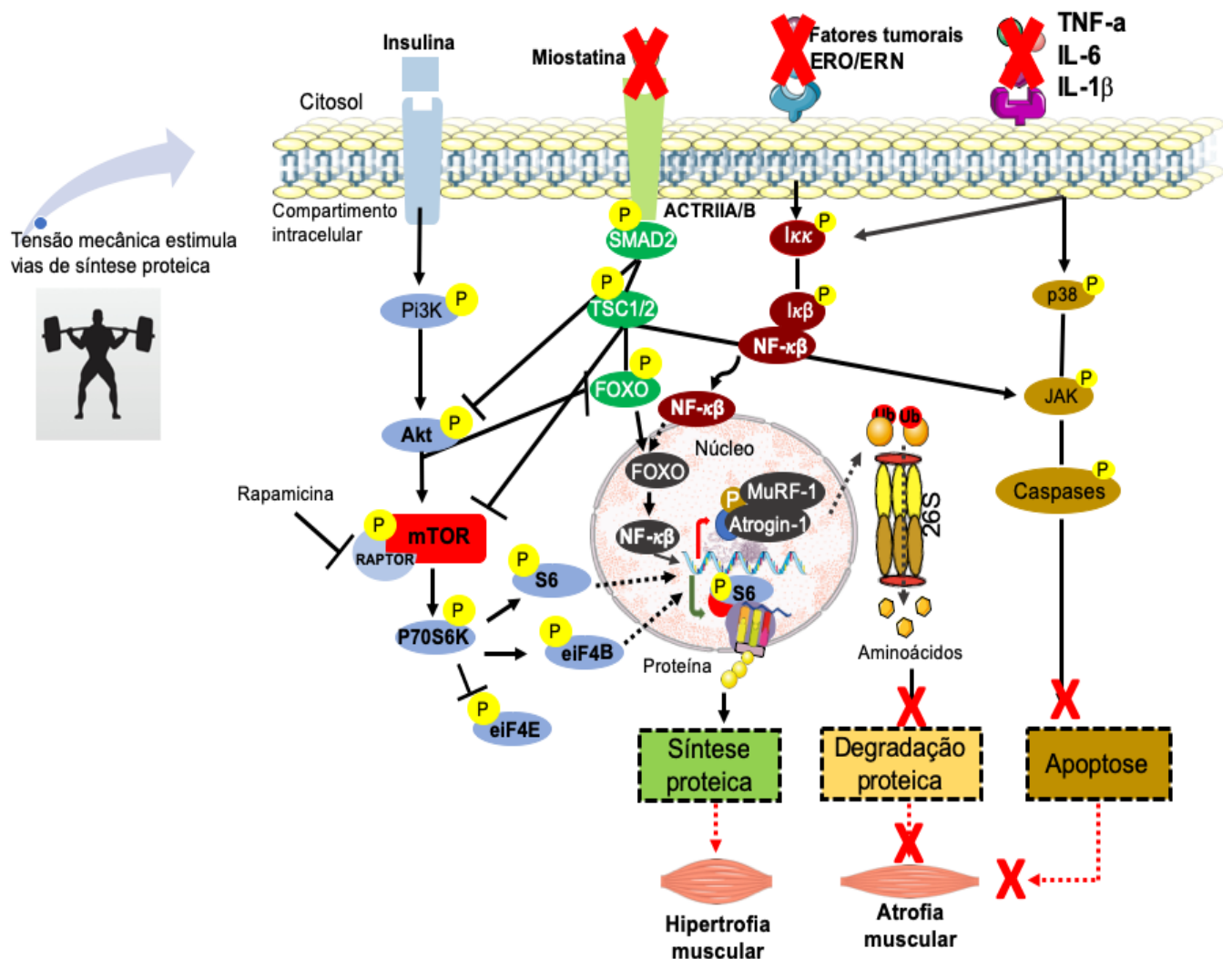


Figura 5: Sinalização de síntese proteica muscular induzida pelo TR (adaptado de FEARON *et al.*, 2012).

3. JUSTIFICATIVA

O músculo esquelético é severamente afetado pela síndrome da caquexia associada ao câncer e a perda gradual de massa muscular está associada à redução da expectativa de vida em pacientes com câncer. O TR é um potente promotor da hipertrofia muscular, sendo a ativação do eixo Akt/mTOR e promoção da síntese de diversas proteínas contráteis e reestabelecimento do glicogênio muscular induzidos pelo TR, um dos mecanismos mais conhecidos para essa hipertrofia. Apesar de estudos recentes terem demonstrado ação anti-atrófica do TR em modelos de caquexia do câncer (PADILHA et al. 2017a), a contribuição da via anabólica Akt/mTOR e da hipertrofia muscular sobre a função anti-atrófica do TR em animais com caquexia associada ao câncer é desconhecida.

4. HIPÓTESE

A hipótese levantada na presente tese é de que os efeitos anti-atróficos induzidos pelo TR são inerentes à ativação da via de sinalização de síntese de proteína Akt/mTOR para promover hipertrofia muscular nos ratos inoculados com tumor de Walker-256.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a contribuição da sinalização de síntese de proteína via Akt/mTOR induzida pelo TR na atenuação da atrofia muscular em ratos inoculados com tumor de Walker-256.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar os efeitos terapêuticos de quatro semanas de TR com cargas progressivas no desenvolvimento da caquexia induzida pelo tumor de Walker-256;
- Avaliar o efeito do tratamento com inibidor farmacológico da mTOR (Rapamicina) isolado e associado ao TR no desenvolvimento da caquexia;

6. MÉTODOS

6.1 ANIMAIS E TRATAMENTO

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Londrina (CEUA n 9647.2015.12) (**Anexo 1**) e conduzido conforme o posicionamento de Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments (ARRIVE). Foram utilizados ratos Wistar machos pesando 130-150g provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina e mantidos no Biotério setorial do Departamento de Educação Física durante todo o estudo. Os animais foram acomodados em gaiolas coletivas contendo 5 animais por caixa, com ciclo claro/escuro 12h, temperatura controlada de $\pm 22^{\circ}\text{C}$ e com acesso a ração (Nuvilab CR-1, Nuvital) e água *ad libitum*. O presente trabalho foi conduzido em dois experimentos, conforme descrito a seguir.

6.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

6.2.1. Experimento 1: Efeito do TR sobre a Caquexia do Câncer

Trinta e sete ratos Wistar machos foram alocados aleatoriamente nos seguintes grupos, controle sedentário (C, n=9), inoculados com tumor sedentários (T, n=9), controle exercitados (E, n=9) e inoculados com tumor exercitados (TE, n=10). Os ratos dos grupos T e TE foram inoculados com células de tumor de Walker-256 (4×10^7 em 500 μL *phosphate buffer saline* (PBS) s.c no flanco direito), enquanto que, os ratos dos grupos C e E foram inoculados com 500 μL de PBS. Após uma semana de familiarização ao aparato de escalada utilizado para o protocolo de TR, os animais dos grupos E e TE realizaram 4 semanas de TR com cargas progressivas conforme

descrito previamente (PADILHA *et al.*, 2017a) e detalhado a seguir. Os animais dos grupos C e T permaneceram confinados em suas caixas durante todo o período experimental. Todos os animais foram eutanasiados ao final de 4 semanas de TR, 48h após a última sessão de exercício.

6.2.2. Experimento 2: O Papel da via de Sinalização Akt/mTOR no Efeito Anti-Atrófico do TR

Dezoito ratos foram alocados aleatoriamente em quatro grupos: controle (C,n=6), controle tratado com Rapamicina (um inibidor farmacológico da via metabólica Akt/mTOR) (R, n=7), inoculados com tumor exercitados (TE,n=8) e inoculados com tumor exercitados tratados com Rapamicina (TER, n=9). Os ratos do grupo TER foram inoculados com células de tumor de Walker-256 conforme descrito no experimento 1. Os ratos receberam Rapamicina (Rapamune Sirulimus®, Wyeth farmacêutica) diariamente por meio de gavagem (1mg/kg/dia em 200 µL de água) e placebo (200 µL de água) durante quatro semanas. Todos os animais foram eutanasiados ao final de 4 semanas de TR, 48h após a última sessão de exercício.

6.3 INOCULAÇÃO DO TUMOR DE WALKER-256

O tumor de Walker-256, um carcinoma mamário, mantido em laboratório por meio de passagens semanais de células viáveis para a cavidade abdominal de ratos Wistar adultos machos (GUARNIER *et al.*, 2010). Para uso do tumor sólido durante a fase experimental, as células foram retiradas do peritônio dos animais utilizados para a manutenção tumoral e contadas em câmara de Neubauer e a viabilidade observada por coloração com azul de Tripán. Foram inoculadas o equivalente à 4×10^7 células no flanco direito dos ratos dos grupos experimentais

(GUARNIER *et al.*, 2010).

6.4 TESTE DE CARGA MÁXIMA E PROTOCOLO DE TR

O teste de carga máxima e TR foram realizados em um aparato em formato de escada (medindo 1,1 x 0,18 m, 2 cm entre os degraus e 80° de inclinação). construído de forma que os animais realizassem de 8 a 12 movimentos dinâmicos (repetições) por subida. Na parte superior da escada, os ratos alcançavam uma câmara de alojamento (medindo 20 x 20 x 20 cm) onde descansaram por dois minutos entre os esforços. Previamente ao teste de carga máxima e ao TR, os ratos foram familiarizados durante cinco dias consecutivos a subir o aparato de escada, estimulados com leves impulsos (empurrões) como estratégia para iniciar o movimento. Após cinco dias, os animais foram capazes de subir voluntariamente a escada sem o auxílio do pesquisador. Não foi adicionada sobrecarga no período de familiarização.

Após o processo de familiarização, foi realizado o teste de carga máxima que consistiu em subir o aparato de escada com peso atado a cauda. A primeira subida consistiu em um carga referente a 75% do peso corporal dos ratos. Após a subida com a carga referente a 75% do peso corporal, foi acrescentado ~30g de peso e a subida estimulada. Esse procedimento foi sucessivamente repetido até que os ratos não conseguissem subir todo o comprimento da escada em três tentativas consecutivas. A maior carga carregada por todo o comprimento da escada, foi considerada a carga máxima (PADILHA *et al.*, 2017a).

O protocolo de TR com cargas progressivas consistiu em 4 subidas completas, carregando consecutivamente 50%, 75%, 90% e 100% da carga máxima alcançada no teste, após 4 subidas, ~30g foi acrescentado e o animal submetido a uma nova tentativa. Este procedimento foi repetido até a falha voluntária em três

tentativas consecutivas e um máximo de 8 subidas. Nas sessões subsequentes do treinamento, as progressões das cargas foram ajustadas de acordo com a carga máxima carregada na sessão anterior de exercício. Esse procedimento foi realizado 3 vezes por semana durante 4 semanas (PADILHA *et al.*, 2017a) (**Figura 6**).

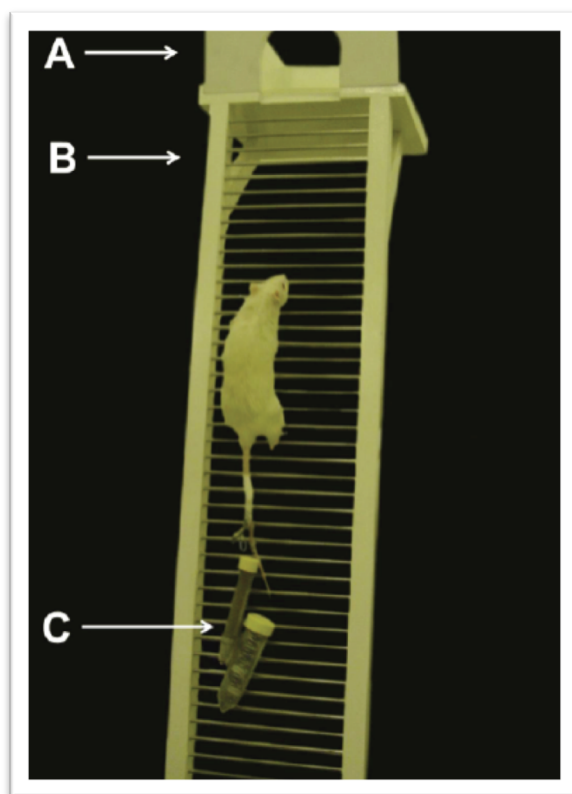


Figura 6. Escada utilizada para o protocolo de TR empregado. Parte superior de descanso (A), degraus da escada (B), tubos cônicos com carga atado a cauda do animal para controle da sobrecarga do esforço.

6.5 EUTANÁSIA, COLETA E PREPARO DOS TECIDOS

Após 48h da última sessão de exercício os animais foram anestesiados com quetamina e cloridrato de xilazina (65 mg/kg, via i.m), e eutanasiados por exsanguinação. O sangue foi colhido em tubos de coleta heparinizados, centrifugado (13.000 rpm, durante 10 min) e armazenado a -80°C para posteriores análises das interleucinas-6, 10 (IL-6, IL-10) e TNF- α . Uma fração da amostra de sangue total foi separada antes da centrifugação e utilizada para

contagem de células mononucleares periféricas. Os músculos sóleo, plantar, flexor longo do *hallux* (FHL), gordura epididimal, gordura retroperitoneal e tumor foram coletados e pesados. Uma fração dos músculos coletados foram armazenados a -80°C para posteriores análises de biologia molecular e outra fração dos músculos coletados foram imediatamente imersas em paraformaldeído 4% (p/v) para o processamento da análise histológica.

6.6 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Para análise em microscopia ótica, uma fração dos tecidos coletados no momento da eutanásia foi colocada em cassetes na solução fixadora de paraformaldeído 4% (p/v) em PBS, pH 7,4 onde permaneceu submersa por 24 horas a 4°C . Os cassetes foram transferidos e permaneceram submersos em PBS por 24 horas a 4°C . Então, foram desidratados em banhos com concentrações crescentes de álcool e incluídos em parafina. Após a inclusão em blocos de parafina, os tecidos foram seccionados em micrótomo rotatório (Lupetec MRP 2015). Foram realizados cortes semi-seriados de $5\ \mu\text{m}$. Para análise da área de secção transversa (AST) os cortes foram corados com hematoxilina e eosina (H&E), e as imagens foram capturadas no aumento de 100x em um microscópio ótico (Olympus) para quantificação da AST (~1.200 áreas por grupo).

6.7 ANÁLISE DE CITOCINAS, CONTAGEM DE CÉLULAS MONONUCLEARES PERIFÉRICA E ESTRESSE OXIDATIVO

A determinação das concentrações de TNF- α , IL-6 e IL-10 foram realizadas por meio de kit comercial para ensaio imunoenzimático (ELISA) (Affymetrix e Bioscience®, San Diego, USA). A contagem e diferenciação das células

mononucleares periférica foram realizadas usando um contador automático (BD® Accuri C6).

Uma fração do músculo FHL foi homogeneizada em solução PBS 50 mmol/L, pH 7,0 e posteriormente centrifugado a 10.000 rpm durante 10 min a 4°C. A determinação de *thiobarbituric acid reactive substances* (TBARS) foi realizada conforme previamente descrito por COSTA (2006). A determinação de *advanced oxidation protein products* (AOPP) foram determinados pelo método previamente descrito por WITKO-SARSAT *et al.*, (1996).

6.8 DETERMINAÇÃO DA EXPRESSÃO DE RNAM POR PCR EM TEMPO REAL

O RNA total foi extraído de 50 mg de músculo FHL usando um kit RiboPure (Ambion, part number AM 1924, USA) de acordo com as instruções do fabricante. O RNA total extraído foi quantificado utilizando um espectrofotômetro para baixos volumes em densidade ótica 260 e 280 nm (NanoDrop2000c, Thermo Scientific, USA). Foi removido DNA contaminante do RNA extraído utilizando o kit DNase I (DNA-livre Kit, Ambion, número AM1906, USA). O DNA complementar (DNAc) foi sintetizado a partir de 1.000ng do RNA total extraído usando um kit de transcrição reversa de DNAc de alta capacidade (Applied Biosystems, número 4374966, USA). A quantificação da *polymerase chain reaction* (PCR) foi realizada usando um sistema em tempo real (ViiA7, Applied Biosystems, USA). Os seguintes ensaios de expressão gênica foram realizados utilizando *Taqman*® *Gene Expression* (Applied Biosystems, USA): FBXO32 (F-box proteína 32) Rn00591730_m1 e mTOR (mecanismo alvo de Rapamicina serine/threonine kinase) Rn00571541_m1. As amplificações das reações foram realizadas em triplicadas e *peptidylprolyl isomerase A* (PPIA) foi utilizado como gene de referência para normalizar as reações. A

expressão relativa foi determinada pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$ e apresentado em expressão relativa do RNAm dos genes FBXO-32 e mTOR.

6.9 ANÁLISE POR WESTERN BLOTTING

Foram extraídas proteínas do músculo FHL utilizando tampão de extração [50 mM HEPES, 40 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1,5 mM Na₃VO₄, 50 mM NaF, 0,1% *sodium dodecyl sulfat* (SDS), 0,1% Triton X-100, coquetel de inibidores de fosfatase e protease (#5872 Cell Signaling Technology)]. A proteína total foi determinada pelo método *bicinchoninic acid assay* (BCA) (QPRO-BCA *protein assay*. Cyanagen, Bologna, Italy). A quantidade equivalente a 20µg de proteínas foi utilizada para quantificar a expressão de atrogin-1, MuRF-1 e GAPDH, e 80µg de proteínas para quantificar a expressão de P70S6K e p-P70S6K. As proteínas foram separadas de acordo com o peso molecular por eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS 10%, em tampão de corrida [25 mM Tris-base, 1,92 M glicina, pH 8.6 e 1% SDS] conforme descrito por LAEMMLI (1970). As proteínas separadas no gel, foram então, transferidas para uma membrana de *polyvinylidene difluoride* (PVDF) (Immun-Blot® PVDF Membrane Bio-Rad) em tampão de transferência [25 mM Tris-base, 192 mM glicina, pH 8,3 e 20% metanol] durante 3 horas (40V). Para o bloqueio das ligações inespecíficas do anticorpo, foi utilizado uma solução com 5% (p/v) de leite em pó desnatado em tampão *Tris-Buffer Saline* [100 mM Tris, 1,5 mM NaCl, pH 8,0 e 0,1% Tween-20] (TBS-T) por 1 hora em temperatura ambiente em agitador horizontal. Então, as membranas foram incubadas com anticorpo primário com 5% de albumina de soro bovino livre de gordura em TBS-T (anti-Fbx32/atrogin-1 1:1000 ab74023, anti-MuRF-1 1:1000 ab172479, anti-P70S6K 1:1000 Cell Signaling Technology, anti-p-P70S6K [Thr389] 1:1500 Cell Signaling Technology, anti-GAPDH 1:5.000 Sigma

G9545) *overnight* a 4°C. Após este período, as membranas foram lavadas com TBS-T e incubadas com anticorpo secundário conjugado com peroxidase (anti-Rabbit IgG 1:3.000 Bio-Rad). A imunoreatividade das bandas foi detectada por quimiluminescência aumentada (ECL Bio-Rad) de acordo com a descrição do fabricante. As bandas foram quantificadas usando o programa ImageJ.

6.10 ESTATÍSTICA

Os dados estão apresentados em média \pm desvio padrão. Foi realizado o teste de normalidade de Shapiro Wilk. Foram realizados os seguintes testes de comparação das médias, teste *t* de Student, análise das variâncias (ANOVA) *one-way* e *two-way* seguido do *post-hoc* de Tukey e Kruskal Wallis seguido do *post-hoc* de *Dunn*. Todos os procedimentos estatísticos foram realizados no SPSS 24 e GraphPad Prism 6. O nível de significância adotado foi $p < 0,05$.

7. RESULTADOS

7.1 PROTOCOLO DE TR ATENUA O DESENVOLVIMENTO DA CAQUEXIA INDUZIDA PELO TUMOR DE WALKER-256

O volume do tumor aumentou progressivamente ($P = 0,0008$) representando $7 \pm 2\%$ do peso corporal dos animais ao final de 4 semanas. O crescimento do tumor promoveu redução da ingestão alimentar após duas semanas ($P = < 0,0001$, $-32,3\%$) (**Figura 7B**), redução no ganho de peso corporal ($P = 0,0081$, $-9,85\%$) (**Figura 7A**) e peso da gordura retroperitoneal ($P = 0,0010$, $-40,6\%$) comparado com o controle (**Figura 7C**). Em contrapartida, o TR reestabeleceu a ingestão alimentar ($P = < 0,0001$, $+22,18\%$) (**Figura 7B**), mas não melhorou o ganho

de peso corporal ($P = 0,3707$, +6,35%) em relação ao grupo T (**Figura 7A**).

O desenvolvimento do tumor promoveu atrofia dos músculos FHL ($P = 0,0001$, $P75 = -24\%$) (**Figura 8A**) e do sóleo ($P = 0,006$, $P75 = -11\%$) comparado com o grupo C (**Figura 8B**). Adicionalmente, o crescimento tumoral promoveu perda na carga máxima carregada ($P = <0,0001$, -11,09%) comparado com o grupo C (**Figura 8C**). Por outro lado, o TR promoveu expressiva atenuação da atrofia do músculo FHL ($P = <0,0001$, $P75 = + 45,15\%$) (**Figura 8A**) e do músculo sóleo ($P = 0,038$, $P75 = + 6,63$) comparado com o grupo T (**Figura 8B**). Ainda, o TR promoveu aumento da capacidade de carga máxima ($P = < 0,0001$, $P75 = + 75\%$) comparado com o grupo T (**Figura 8C**).

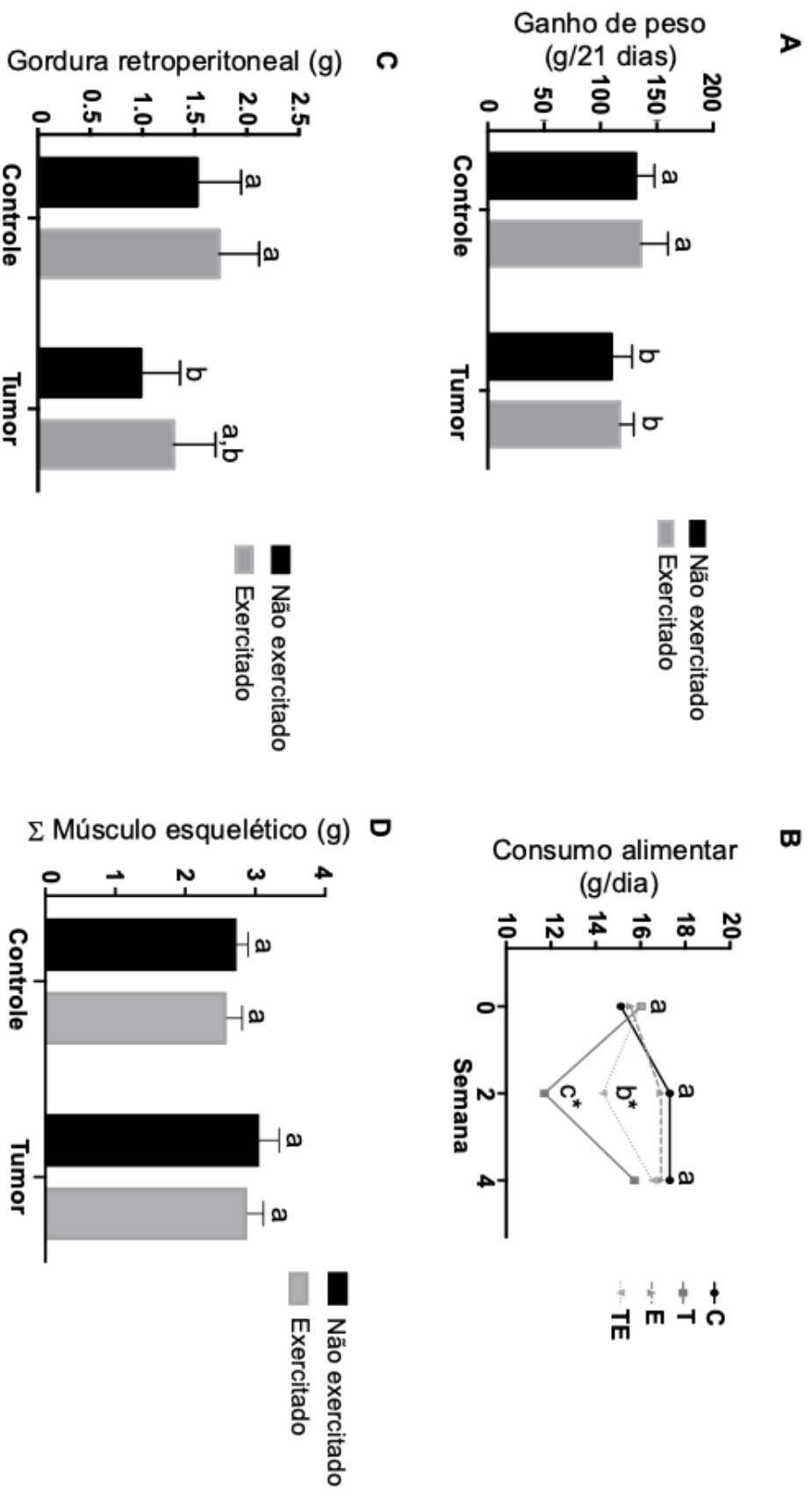


Figura 7. Caracterização da caquexia associada ao câncer dos grupos controle não exercitado e exercitado, tumor não exercitado e exercitado. Os dados estão apresentados em média \pm desvio padrão. ^{a,b,c} Diferentes letras representam diferença significativa entre os grupos e * representa diferença significativa da semana anterior ($P < 0,05$, ANOVA *two-way* seguido do pós teste de Tukey). (A) ganho de peso, (B) consumo alimentar, (C) peso da gordura retroperitoneal e (D) somatória peso dos músculos.

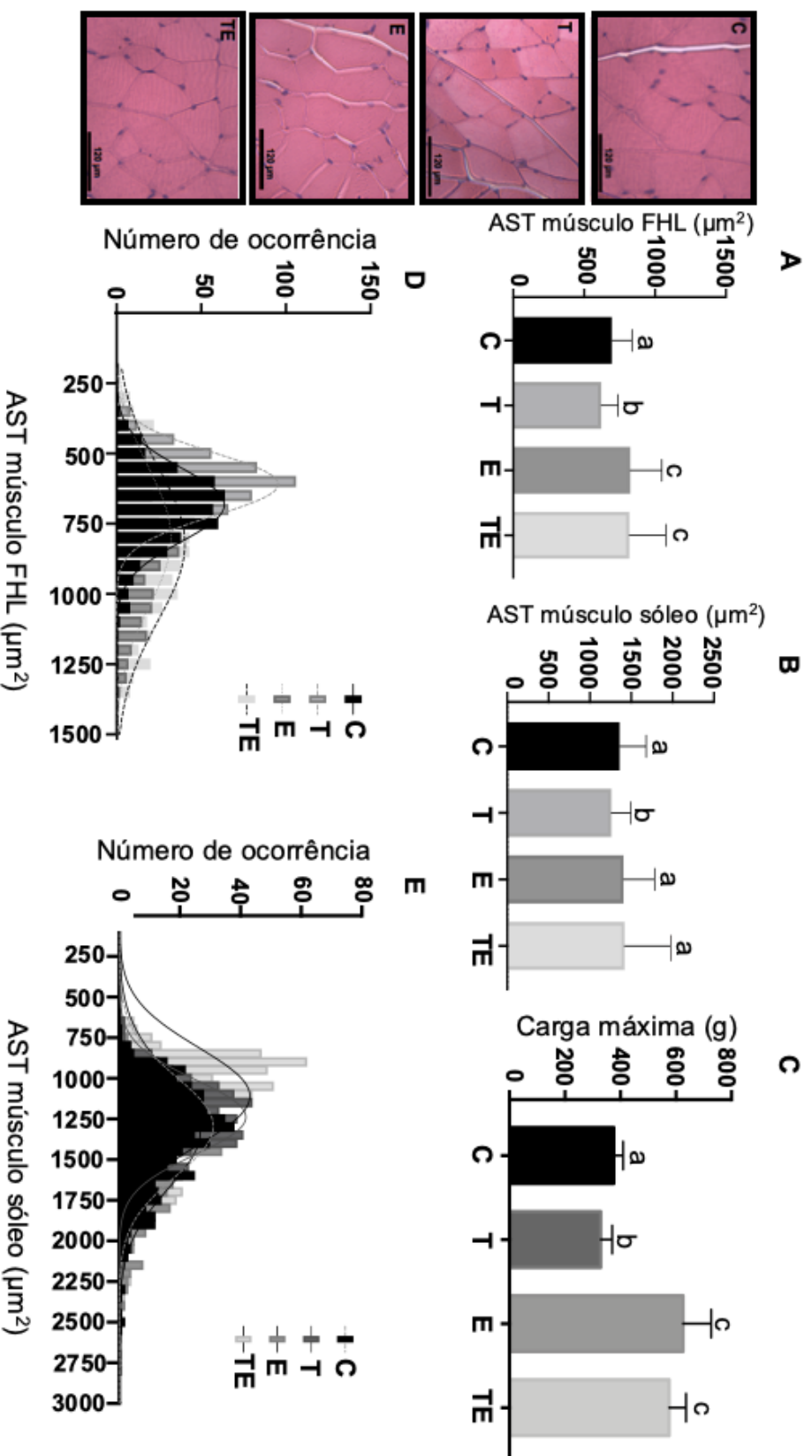


Figura 8. Parâmetros de atrofia e função muscular nos grupos controle (C), tumor (T), exercício (E) e tumor-exercício (TE). Os dados estão apresentados em média \pm desvio padrão. ^{a,b,c} Diferentes letras representa diferença significativa entre os grupos ($P < 0,05$, *Kruskal Wallis* para AST e *one-way ANOVA* para carga máxima seguido do pós teste de Tukey). (A) área de secção transversa músculo FHL, (B) área de secção transversa músculo sóleo, (C) carga máxima levantada, (D) distribuição áreas das fibras músculo FHL e (E) distribuição áreas das fibras músculo sóleo.

7.2 EXPRESSÃO DE GENE E PROTEÍNAS-CHAVE DA VIA DE SINALIZAÇÃO AKT/MTOR NA ATROFIA MUSCULAR

Com relação à expressão do gene-chave mTOR, embora o TR tenha promovido aumento da expressão do RNAm para mTOR no grupo E comparado com o grupo C ($P = 0,001$), o mesmo não foi observado após a inoculação do tumor de Walker-256 e o protocolo de TR comparado com o grupo T ($P = 0,998$) (**Figura 9A**).

Além disso, a implantação do tumor promoveu menores concentrações da proteína-chave P70S6K ($P = 0,0274$, -26,4%) (**Figura 9B**) e p-P70S6K ($P = 0,0348$, -33,7%) comparado com o grupo C (**Figura 9C**). Por outro lado, o protocolo de TR empregado promoveu maiores concentrações da proteína P70S6K ($P = < 0,0001$, +141%) (**Figura 9A**) e da p-P70S6K ($P = < 0,0001$, +165,1%) comparada com o grupo T (**Figura 9B**). Porém, não houve diferença na razão P70S6K/p-P70S6K ($P = 0,068$, +1,13%) em relação ao grupo T (**Figura 9D**).

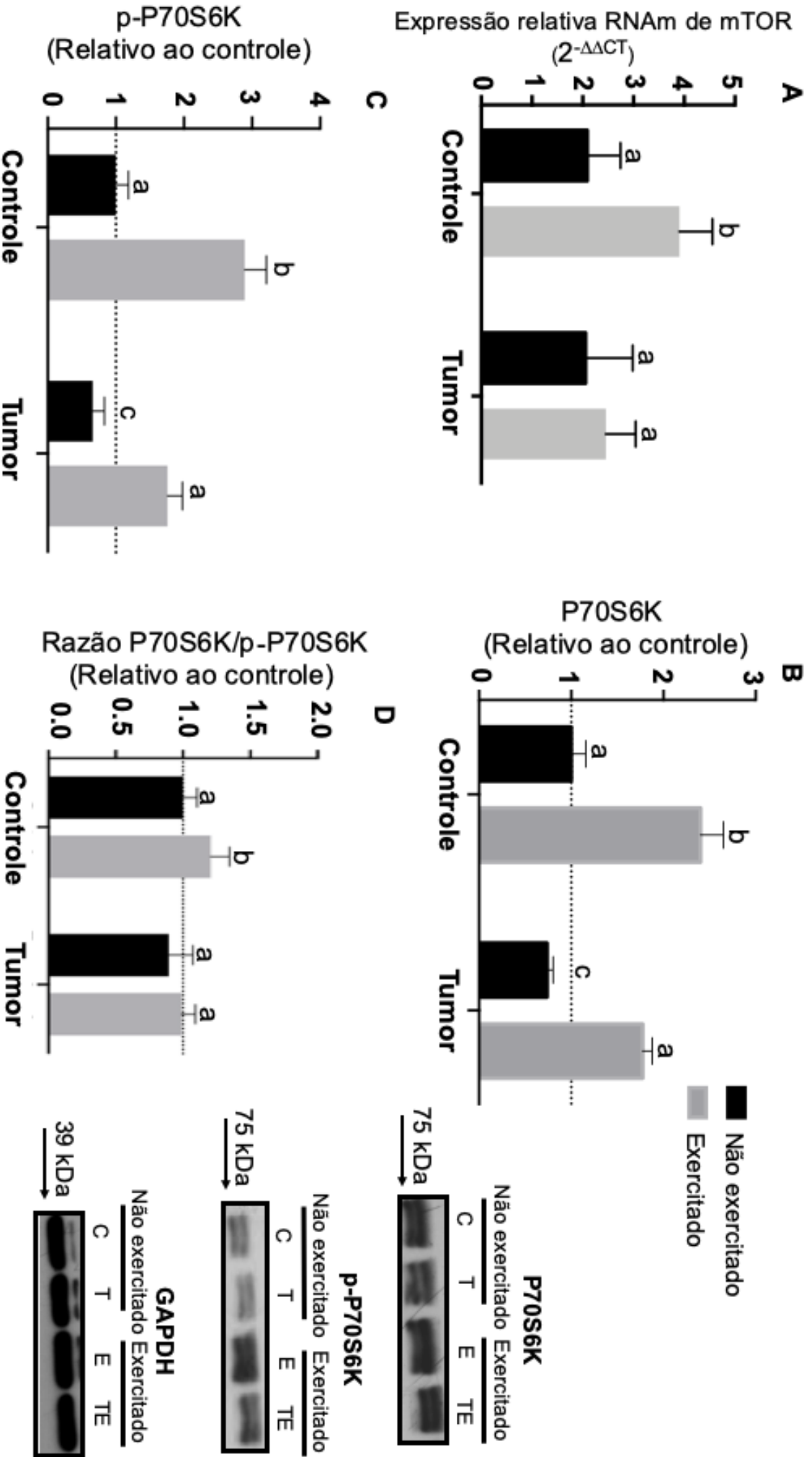
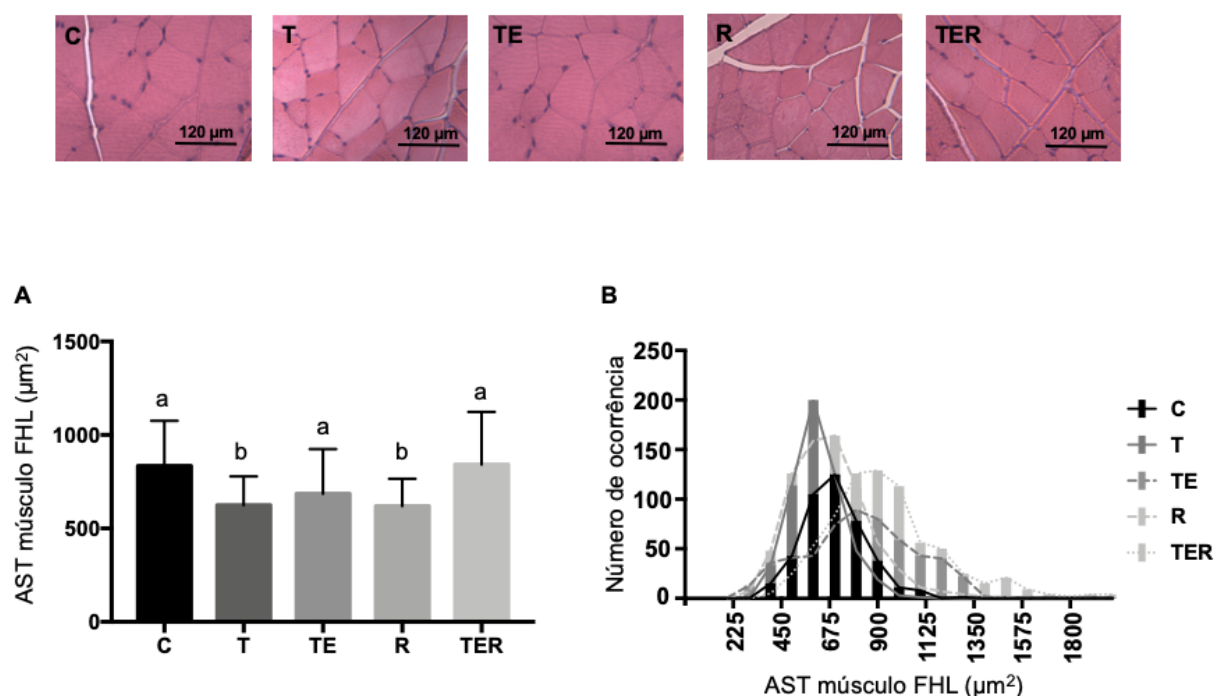


Figura 9: Concentração de gene e proteína-chave da via de sinalização Akt/mTOR nos grupos controle não exercitado e exercitado, tumor não exercitado e exercitado. Os dados estão apresentados em média \pm desvio padrão, linha tracejada representa valor relativo ao controle. ^{a,b,c} Diferentes letras representa diferença significativa entre os grupos ($P < 0,05$, ANOVA *two-way* seguido do pós teste de Tukey). (A) expressão relativa RNAm de mTOR, (B) expressão da proteína P70S6K, (C) p-P-70S6K e (D) razão P70S6K/p-P70S6K.

7.3 TR ATENUA A ATROFIA MUSCULAR INDEPENDENTEMENTE DA VIA DE SINALIZAÇÃO AKT/MTOR NA CAQUEXIA ASSOCIADA AO CÂNCER

A inibição do complexo mTOR por via farmacológica (rapamicina) promoveu atrofia do músculo FHL ($P = < 0,0001$, $P75 = -14\%$) quando comparado com o grupo C. Diferentemente, o tratamento com rapamicina combinado com TR atenuou a atrofia no músculo FHL ($P = < 0,0001$, $P75 = + 9,29$) quando comparado com o grupo R (**Figura 10**).



7.4 TR ATENUA A ATROFIA MUSCULAR POR MEIO DA DIMINUIÇÃO DA INFLAMAÇÃO SISTÊMICA, DANO OXIDATIVO E PROTEÍNAS-CHAVE DA VIA UBIQUITINA PROTEASSOMA

Com relação aos mediadores sistêmicos da resposta inflamatória, a implantação do tumor aumentou o número de leucócitos totais circulantes ($P = 0,0002$, +150%) (**Figura 11A**), dos leucócitos totais houve aumento da porcentagem de monócitos ($P = 0,003$, +185,6%) (**Figura 11B**) e não houve alteração da porcentagem de linfócitos ($P = 0,155$, +43,1%) quando comparado com o grupo C (**Figura 11C**). Além disso, a progressão do tumor provocou maiores concentrações circulantes de TNF- α ($P = 0,001$, +238%) (**Figura 11D**) e IL-6 ($P = <0,001$, +422%) em relação ao grupo C (**Figura 11E**). Quando avaliada a interferência dos mediadores circulantes da resposta inflamatória sobre o dano oxidativo no músculo FHL, foram observadas maiores concentrações de TBARS ($P = 0,0001$, +135%) (**Figura 11F**) e AOPP ($P = < 0,0001$, +656%) em relação ao grupo C (**Figura 11G**).

Ainda, os mediadores da resposta inflamatória tanto local quanto circulante foi acompanhada de maior expressão de RNAm do gene FBXO-32 ($P = 0,0007$, +204%) (**Figura 12A**) e maiores concentrações da proteína MAFbx/atrogin-1 ($P = < 0,0001$, +308%) (**Figura 12B**) e MuRF-1 ($P = 0,0004$, +388%) quando comparado com o grupo C (**Figura 12C**).

Por outro lado, o TR promoveu menor concentração de leucócitos circulantes ($P = 0,048$, - 37%) (**Figura 11A**), porcentagem de monócitos ($P = 0,004$, - 46,5%) (**Figura 11B**), porém não modificou a porcentagem de linfócitos ($P = 0,66$, - 27,3%) em relação ao grupo T (**Figura 11C**). O TR também resultou em menores concentrações sistêmicas de TNF- α ($P = 0,0002$, - 60,5%) (**Figura 11D**), IL-6 ($P = 0,0001$, - 71,3%) (**Figura 11E**), maior concentração circulante de IL-10 ($P = 0,0010$, + 224%) (**Figura 11H**) e a razão IL-10/ TNF- α ($P = 0,001$, + 78%) em relação ao grupo

(Figura 11I)T. No músculo esquelético houve maior nível de AOPP ($P = <0,0001$, - 81,2%) relação ao grupo T (Figura 11G). Além disso, o TR promoveu menor concentração da proteína MAFbx/atrogin-1 ($P = 0,032$, - 43,2%) em relação ao grupo T (Figura 12C).

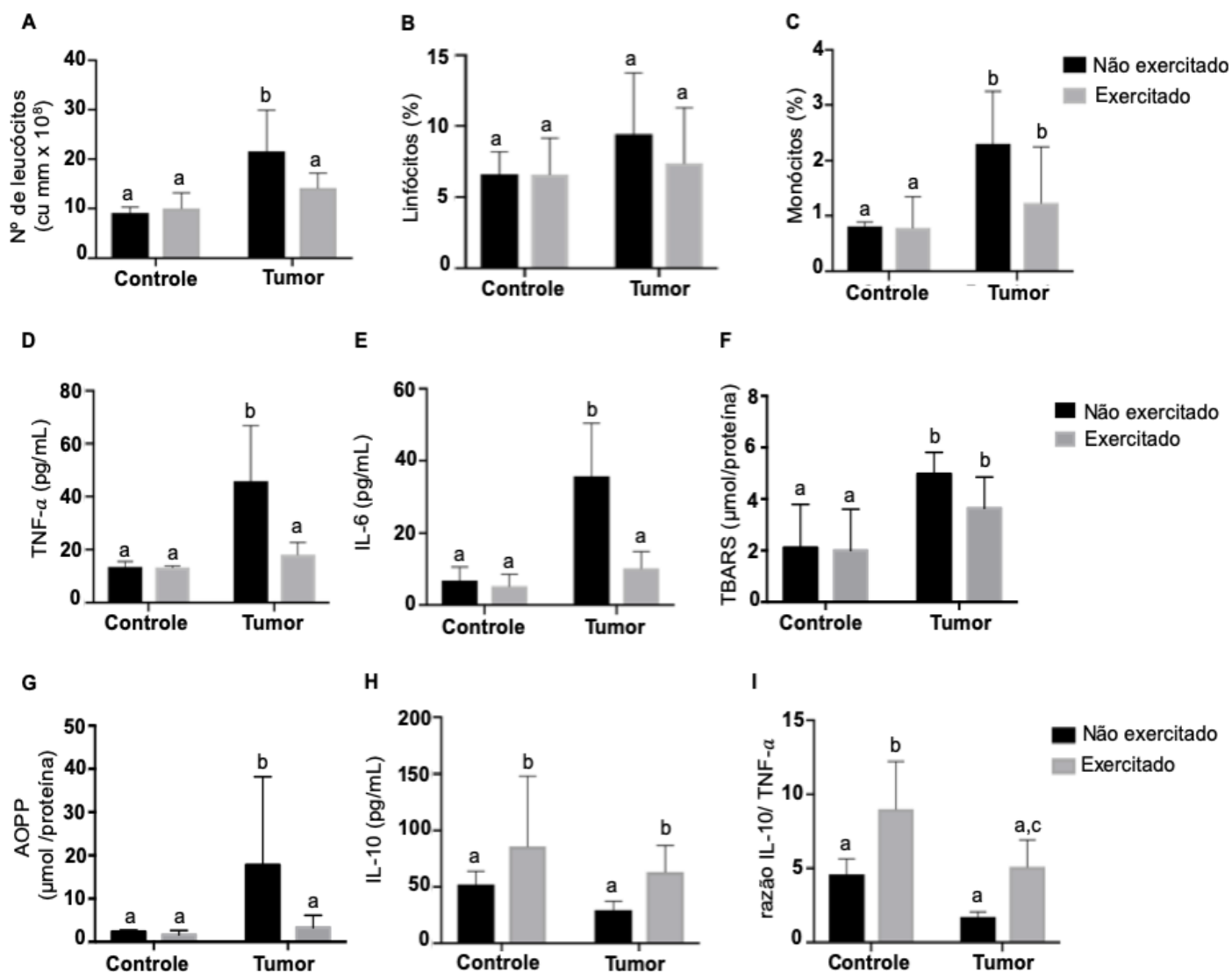


Figura 11: Mediadores pró- e anti-inflamatórios e dano oxidativo no músculo FHL nos grupos controle não exercitado e exercitado, tumor não exercitado e exercitado. Os dados estão apresentados em média \pm desvio padrão. ^{a,b,c} Diferentes letras representa diferença significativa entre os grupos ($P < 0,05$, ANOVA *two-way* seguido do pós teste de Tukey). (A) Nº de leucócitos, (B) linfócitos, (C) monócitos, (D) TNF- α , (E) IL-6, (F) TBARS, (G) AOPP, (H) IL-10 e razão IL-10/ TNF- α (I).

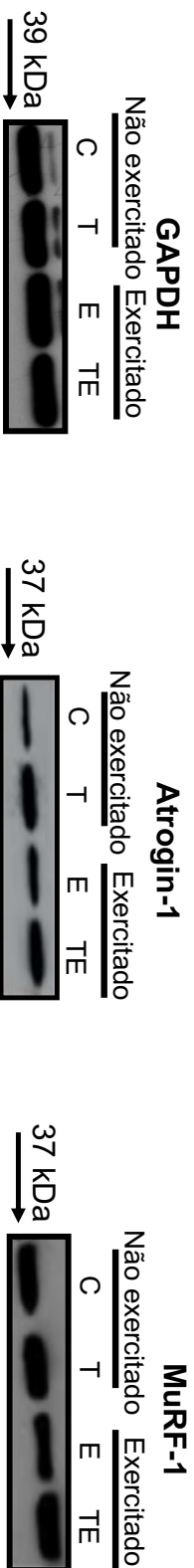
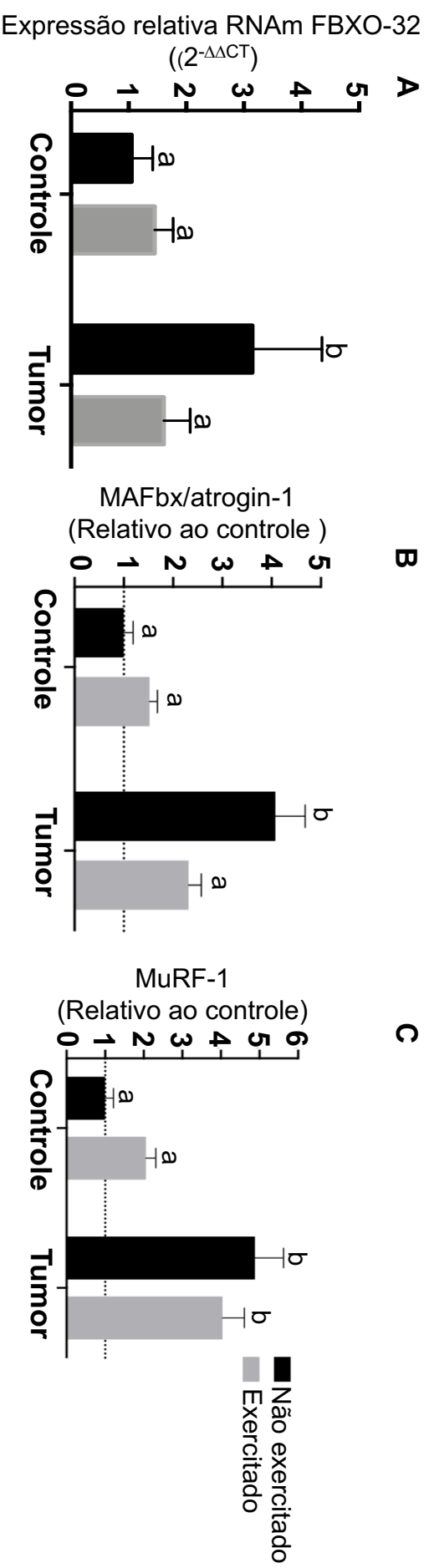


Figura 12. Mediadores chave do sistema ubiquitina proteassoma nos grupos controle não exercitado e exercitado, tumor não exercitado e exercitado. Os dados estão apresentados em média \pm desvio padrão. ^{a,b,c} Diferentes letras representa diferença significativa entre os grupos ($P < 0,05$, ANOVA two-way seguido do pós teste de Tukey). (A) Expressão relativa de RNAm do gene FBXO-32, (B) expressão da proteína atrogin-1 e (C) expressão da proteína MuRF-1.

8. DISCUSSÃO

A presente tese é pioneira em demonstrar que a ativação da proteína via sinalização Akt/mTOR parece não ser decisiva na atenuação da atrofia muscular induzida pelo protocolo de TR, como foi demonstrado pela atenuação da atrofia muscular induzida pelo câncer, mesmo quando os animais foram tratados com Rapamicina. Desta forma, o achado refuta a hipótese inicial levantada nessa tese. Os principais achados deste trabalho sugerem que a atenuação da atrofia muscular promovida pelo protocolo de TR com cargas progressivas empregado está associada à redução de citocinas pró-inflamatórias e indicadores de dano oxidativo no músculo FHL contribuindo para considerável redução da expressão da proteína atrogin-1 via sistema ubiquitina proteassoma. Portanto, a diminuição da inflamação sistêmica e degradação de proteínas induzida pelo TR parecem ser determinantes para atenuar a atrofia muscular induzida no câncer.

Diferentemente do corpo de evidências sobre mecanismos envolvidos na degradação de proteína na atrofia muscular, pouco se sabe sobre a contribuição dos mecanismos que regulam a síntese de proteína na caquexia associada ao câncer (SCHIAFFINO *et al.*, 2013). Após quatro semanas de tratamento sustentado com rapamicina foi observado atrofia muscular similar à atrofia induzida pela inoculação de células tumorais. Uma vez que a mTOR tem sua atividade inibida por esse composto, e ainda não são conhecidos outros alvos da rapamicina que poderia confundir nosso achado (DAVIES *et al.*, 2000). É importante destacar ainda a complexidade da regulação da mTOR em diferentes tecidos (KIM *et al.*, 2002), ou seja, o efeito sistêmico de inibidores análogos de rapamicina pode ser uma limitação. Nesse trabalho, o tratamento com rapamicina não anulou os efeitos do TR empregado,

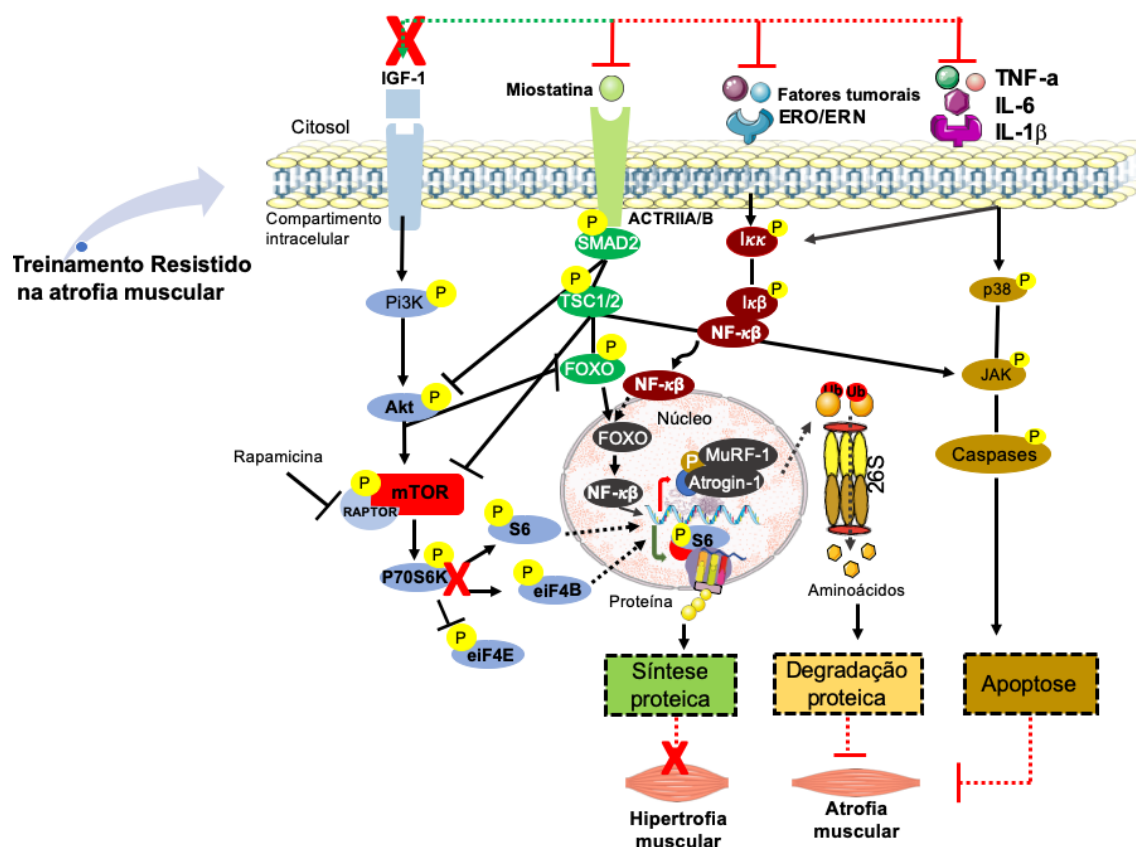


Figura 14: Atenuação da atrofia muscular via sinalização de degradação proteica após programa de TR através da redução dos mediadores pró-inflamatórios.

ou seja, mesmo com a inibição da mTOR e seus alvos abaixo, foi observado aumento significativo da AST muscular.

Ainda que a mTOR exerça um papel crucial na regulação, proliferação e crescimento celular (BODINE *et al.*, 2001) ainda permanece pouco compreendido sua contribuição na caquexia associada ao câncer. De fato, altas concentrações de citocinas anti-inflamatórias, tais como, IL-10 e IL-1ra induzido pelo TR, recuperam a fosforilação de IGF-1/Akt e esta fosforilação impacta nos alvos abaixo da mTOR, por exemplo, mTOR/4E-BP1 ou mTOR/P-70S6K (WINTER *et al.*, 2012; LIRA *et al.*, 2014). No presente estudo, os componentes que regulam o crescimento muscular via Akt/mTOR, foram modificados em parte. Nossos resultados mostram que o TR provocou maior expressão da proteína P70S6K e p-P70S6K. Contudo a razão P70S6K/p-P70S6K não foi modificada em relação ao grupo inoculado com tumor de

Walker-256. Por outro lado, em estudo publicado por BACURAU *et al.*, (2016) demonstraram que o treinamento aeróbio promove ativação da via IGF-1/Akt/mTOR, atenuando dessa forma a atrofia muscular na caquexia associada à insuficiência cardíaca (BACURAU *et al.*, 2016).

Diversos fatores humorais produzidos tanto pelo hospedeiro quanto pelo tumor trabalham em conjunto para regular o comportamento energético, que afeta diretamente a taxa de síntese e degradação de proteínas (FEARON *et al.*, 2006; EZEIKE e MORLEY, 2015). Nossos resultados demonstram que houve menores concentrações sistêmicas das citocinas IL-6 e TNF- α após o protocolo de TR com cargas progressivas. Altas concentrações de IL-6, TNF- α e IFN- γ têm sido encontradas tanto em ratos inoculados com diferentes linhagens de células tumorais quanto em pacientes caquéticos (SMITH e TISDALE, 1993; TISDALE, 2010b; SEELAENDER *et al.*, 2012). A esse respeito, várias citocinas pró-inflamatórias liberadas pelo tumor têm demonstrado contribuir para o desbalanço energético no hospedeiro, principalmente nas vias dependentes de insulina (TISDALE, 2010a; ARGILÉS, FONTES-OLIVEIRA, *et al.*, 2014). Por outro lado, foi observado que o TR alterou positivamente a IL-10 aumentando as suas concentrações sistêmicas. Sabe-se que a massa muscular esquelética quando em atividade contrátil é um importante órgão endócrino capaz de secretar substâncias de atuação autócrina, parácrina e endócrina favoráveis para reestabelecer a sensibilidade à insulina e os estoques de glicogênio desse tecido (PEDERSEN e FEBBRAIO, 2008; 2012). Alguns estudos mostram que o treinamento aeróbico ou de *endurance* promove a liberação de citocinas anti-inflamatórias, dentre as mais citadas estão, IL-10 e IL-1ra (OSTROWSKI *et al.*, 1999; PETERSEN e PEDERSEN, 2005; BATISTA *et al.*, 2009; FRAJACOMO *et al.*, 2015). Dessa forma, o protocolo de TR também foi efetivo na promoção de um

cenário anti-inflamatório no hospedeiro, podendo ter contribuído para diminuir a sinalização de vias catabólicas (PADILHA *et al.*, 2017a).

A massa e função muscular são dois importantes preditores de sobrevida e tolerância ao tratamento da caquexia associada ao câncer (FEARON, 2008; COLETTI, 2018; PENNA *et al.*, 2019). Vários estudos pré clínicos no campo da caquexia associada ao câncer sugerem que os regimes de exercícios, especialmente o TR, podem ser incluídos no tratamento multimodal da caquexia no câncer (DAS NEVES *et al.*, 2016; DEMINICE *et al.*, 2016; KHAMOUI *et al.*, 2016; PADILHA *et al.*, 2017a). KHAMOUI *et al.*, (2016) propuseram a combinação do treinamento aeróbico combinado com o treinamento de força sobre os parâmetros de atrofia muscular em camundongos inoculados com modelo de carcinoma de cólon-26. Os achados desse estudo demonstram que o treinamento aeróbio ou treinamento de força isolado promoveu menor expressão de RNAm das enzimas ligases músculo dependente (MuRF-1, atrogin-1 e miostatina no músculo gastrocnêmio). A implicação da sobrecarga corrigiu a atrofia muscular e hiperexpressão da miostatina, sugerindo que o treinamento aeróbio e/ou treinamento de força isolado podem ter efeitos divergentes sobre o *turnover* proteico dependendo da condição caquética (KHAMOUI *et al.*, 2016). Um estudo publicado previamente por nosso grupo de investigação mostrou que seis semanas de TR anteriormente ao desenvolvimento do tumor (12 dias) preveniu a atrofia muscular, a perda da força muscular, resultou em baixos níveis sistêmico de citocinas pró-inflamatórias e dano oxidativo no músculo esquelético. Concluindo que a realização do TR anteriormente ao desenvolvimento da caquexia pode impedir o avanço dos efeitos deletérios (PADILHA *et al.*, 2017a). Ainda, quatro semanas de TR durante o crescimento tumoral previne o desenvolvimento exacerbado do tumor e diminui consideravelmente a agressividade tumoral (PADILHA *et al.*, 2019). Dessa

forma, é importante notar que protocolo de TR com cargas progressivas promove, pelo menos em parte, a manutenção da força e massa muscular por meio da redução da massa e agressividade tumoral.

De forma notável, a patogênese da caquexia no câncer também envolve mudanças na ingestão nutricional, má absorção dos nutrientes e pouca utilização de substratos energético (ANTOUN e RAYNARD, 2018). A ocorrência da má nutrição na caquexia associada ao câncer reflete na perda involuntária de peso corporal (ARENDS *et al.*, 2017) resultando na fraqueza muscular (REID e MOYLAN, 2011). Conforme foi observado no presente trabalho, o protocolo de TR empregado reestabeleceu o consumo alimentar após duas semanas de experimento sem apresentar alteração no ganho de peso corporal. Contudo, no presente trabalho não foi realizado o pareamento da ingestão alimentar entre os grupos, sendo dessa forma uma limitação para esse desfecho. Ainda, o ganho de força muscular foi preservado ao longo de todo experimento. Dessa forma, estes desfechos clínicos promovidos pelo protocolo de TR são importantes para obtenção de um bom prognóstico da síndrome (ARGILÉS *et al.*, 2010; GALVÃO *et al.*, 2010; ARGILÉS *et al.*, 2019).

Os resultados obtidos neste trabalho amplificam o conhecimento sobre como o protocolo de TR empregado interfere em dois mecanismos envolvidos na atrofia muscular associada à caquexia no câncer. Foi possível ainda constatar que o protocolo de TR modula de maneira positiva os desfechos clínicos da síndrome, contribuindo para futuras implementações deste tipo de treinamento na terapia multimodal em pacientes com câncer.

CONCLUSÃO

Conclui-se que a via de sinalização Akt/mTOR pouco contribuiu para atenuação da atrofia do músculo FHL induzida pelo protocolo de TR em ratos inoculados com tumor de walker-256. A diminuição da degradação proteica via ativação de alvos chave do sistema ubiquitina proteassoma paralelamente à redução de citocinas pró-inflamatórias circulantes e dano oxidativo no músculo esquelético foi mais determinante para atenuar a atrofia muscular.

REFERÊNCIAS

ACHARYYA, S. et al. Cancer cachexia is regulated by selective targeting of skeletal muscle gene products. **J Clin Invest**, v. 114, n. 3, p. 370-8, Aug 2004. ISSN 0021-9738 (Print) 0021-9738.

ACSM. Progression models in resistance training for healthy adults. **Med Sci Sports Exerc**, v. 41, n. 3, p. 687-708, Mar 2009. ISSN 1530-0315. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19204579> >.

ANKER, M. S. et al. Orphan disease status of cancer cachexia in the USA and in the European Union: a systematic review. **J Cachexia Sarcopenia Muscle**, v. 10, n. 1, p. 22-34, Feb 2019. ISSN 2190-6009. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30920776> >.

ANTOUN, S.; RAYNARD, B. Muscle protein anabolism in advanced cancer patients: response to protein and amino acids support, and to physical activity. **Ann Oncol**, v. 29, n. suppl_2, p. ii10-ii17, Feb 2018. ISSN 1569-8041. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29506227> >.

ARENDS, J. et al. ESPEN expert group recommendations for action against cancer-related malnutrition. **Clin Nutr**, v. 36, n. 5, p. 1187-1196, 10 2017. ISSN 1532-1983. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28689670> >.

ARGILÉS, J. M. et al. Cancer cachexia: understanding the molecular basis. **Nat Rev Cancer**, v. 14, n. 11, p. 754-62, Nov 2014. ISSN 1474-1768. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25291291> >.

_____. Cachexia: a problem of energetic inefficiency. **J Cachexia Sarcopenia Muscle**, v. 5, n. 4, p. 279-86, Dec 2014. ISSN 2190-5991. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25118829> >.

ARGILÉS, J. M.; LÓPEZ-SORIANO, F. J.; BUSQUETS, S. Mechanisms and treatment of cancer cachexia. **Nutr Metab Cardiovasc Dis**, v. 23 Suppl 1, p. S19-24, Dec 2013. ISSN 1590-3729. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22749678> >.

_____. Mediators of cachexia in cancer patients. **Nutrition**, v. 66, p. 11-15, Mar 2019. ISSN 1873-1244. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31177056> >.

ARGILÉS, J. M. et al. Optimal management of cancer anorexia-cachexia syndrome. **Cancer Manag Res**, v. 2, p. 27-38, Jan 2010. ISSN 1179-1322. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21188094> >.

ARTHUR, S. T. et al. One-year prevalence, comorbidities and cost of cachexia-related inpatient admissions in the USA. **Drugs Context**, v. 3, p. 212265, 2014. ISSN 1745-1981 (Print) 1740-4398.

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

_____. Akt/mTOR pathway contributes to skeletal muscle anti-atrophic effect of aerobic exercise training in heart failure mice. **Int J Cardiol**, v. 214, p. 137-47, Jul 2016. ISSN 1874-1754. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27060274> >.

BALKWILL, F. R.; MANTOVANI, A. Cancer-related inflammation: common themes and therapeutic opportunities. **Semin Cancer Biol**, v. 22, n. 1, p. 33-40, Feb 2012. ISSN 1096-3650. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22210179> >.

BATISTA, M. L. et al. Anti-inflammatory effect of physical training in heart failure: role of TNF-alpha and IL-10. **Arq Bras Cardiol**, v. 93, n. 6, p. 643-51, 692-700, Dec 2009. ISSN 1678-4170. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20379646> >.

BERDEAUX, R.; STEWART, R. cAMP signaling in skeletal muscle adaptation: hypertrophy, metabolism, and regeneration. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 303, n. 1, p. E1-17, Jul 1 2012. ISSN 0193-1849.

BLAUWHOFF-BUSKERMOLEN, S. et al. Loss of Muscle Mass During Chemotherapy Is Predictive for Poor Survival of Patients With Metastatic Colorectal Cancer. **J Clin Oncol**, v. 34, n. 12, p. 1339-44, Apr 2016. ISSN 1527-7755. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26903572> >.

BODDAERT, M. S.; GERRITSEN, W. R.; PINEDO, H. M. On our way to targeted therapy for cachexia in cancer? **Curr Opin Oncol**, v. 18, n. 4, p. 335-40, Jul 2006. ISSN 1040-8746. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16721127> >.

BODINE, S. C. et al. Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. **Nat Cell Biol**, v. 3, n. 11, p. 1014-9, Nov 2001. ISSN 1465-7392 (Print)
1465-7392.

BOSSOLA, M. et al. Increased muscle proteasome activity correlates with disease severity in gastric cancer patients. **Ann Surg**, v. 237, n. 3, p. 384-9, Mar 2003. ISSN 0003-4932. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12616123> >.

BRAUN, T.; GAUTEL, M. Transcriptional mechanisms regulating skeletal muscle differentiation, growth and homeostasis. In: (Ed.). **Nat Rev Mol Cell Biol**. England, v.12, 2011. p.349-61. ISBN 1471-0080 (Electronic)
1471-0072 (Linking).

CAHLIN, C. et al. Experimental cancer cachexia: the role of host-derived cytokines interleukin (IL)-6, IL-12, interferon-gamma, and tumor necrosis factor alpha evaluated in gene knockout, tumor-bearing mice on C57 Bl background and eicosanoid-

dependent cachexia. **Cancer Res**, v. 60, n. 19, p. 5488-93, Oct 2000. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11034092> >.

CASSANO, M. et al. Cellular mechanisms and local progenitor activation to regulate skeletal muscle mass. **J Muscle Res Cell Motil**, v. 30, n. 7-8, p. 243-53, Dec 2009. ISSN 0142-4319.

CELLA, P. S. et al. Creatine supplementation in Walker-256 tumor-bearing rats prevents skeletal muscle atrophy by attenuating systemic inflammation and protein degradation signaling. **Eur J Nutr**, Feb 2019. ISSN 1436-6215. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30806774> >.

CHESLEY, A. et al. Changes in human muscle protein synthesis after resistance exercise. **J Appl Physiol (1985)**, v. 73, n. 4, p. 1383-8, Oct 1992. ISSN 8750-7587. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1280254> >.

COLEGIO, O. R. et al. Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid. **Nature**, v. 513, n. 7519, p. 559-63, Sep 2014. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25043024> >.

COLETTI, D. Chemotherapy-induced muscle wasting: an update. **Eur J Transl Myol**, v. 28, n. 2, p. 7587, Apr 2018. ISSN 2037-7452. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29991991> >.

COSTA, C. A simple automated procedure for thiol measurement in human serum samples. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 42, n. 5, p. 345-350, 2006.

COURNEYA, K. S. Exercise guidelines for cancer survivors: are fitness and quality-of-life benefits enough to change practice? **Curr Oncol**, v. 24, n. 1, p. 8-9, Feb 2017. ISSN 1198-0052. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28270718> >.

COURNEYA, K. S. et al. Understanding breast cancer patients' preference for two types of exercise training during chemotherapy in an unblinded randomized controlled trial. **Int J Behav Nutr Phys Act**, v. 5, p. 52, 2008. ISSN 1479-5868. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18954442> >.

CRAWFORD, J. Clinical results in cachexia therapeutics. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v. 19, n. 3, p. 199-204, May 2016. ISSN 1473-6519. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26974316> >.

CSIBI, A. et al. eIF3-f function in skeletal muscles: to stand at the crossroads of atrophy and hypertrophy. **Cell Cycle**, v. 7, n. 12, p. 1698-701, Jun 15 2008. ISSN 1551-4005.

CUNNINGHAM, J. T. et al. mTOR controls mitochondrial oxidative function through a YY1-PGC-1 α transcriptional complex. **Nature**, v. 450, n. 7170, p. 736-40, Nov 2007. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18046414> >.

DAMAS, F. et al. A review of resistance training-induced changes in skeletal muscle protein synthesis and their contribution to hypertrophy. **Sports Med**, v. 45, n. 6, p. 801-7, Jun 2015. ISSN 1179-2035. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25739559> >.

_____. Resistance training-induced changes in integrated myofibrillar protein synthesis are related to hypertrophy only after attenuation of muscle damage. **J Physiol**, v. 594, n. 18, p. 5209-22, 09 2016. ISSN 1469-7793. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27219125> >.

DAS NEVES, W. et al. Loss of strength capacity is associated with mortality, but resistance exercise training promotes only modest effects during cachexia progression. **Life Sci**, v. 163, p. 11-22, Oct 2016. ISSN 1879-0631. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27575705> >.

DAVIES, S. P. et al. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. **Biochem J**, v. 351, n. Pt 1, p. 95-105, Oct 2000. ISSN 0264-6021. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10998351> >.

DE LIMA, C. et al. Tumor growth reduction in Walker 256 tumor-bearing rats performing anaerobic exercise: participation of Bcl-2, Bax, apoptosis, and peroxidation. **Appl Physiol Nutr Metab**, v. 36, n. 4, p. 533-8, Aug 2011. ISSN 1715-5312. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21851206> >.

_____. Anaerobic exercise reduces tumor growth, cancer cachexia and increases macrophage and lymphocyte response in Walker 256 tumor-bearing rats. **Eur J Appl Physiol**, v. 104, n. 6, p. 957-64, Dec 2008. ISSN 1439-6319. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18688637> >.

DE MORAIS, H. et al. Insulin, not glutamine dipeptide, reduces lipases expression and prevents fat wasting and weight loss in Walker 256 tumor-bearing rats. **Eur J Pharmacol**, v. 806, p. 67-74, Jul 2017. ISSN 1879-0712. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28390870> >.

DE VOS-GEELEN, J.; FEARON, K. C.; SCHOLS, A. M. The energy balance in cancer cachexia revisited. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v. 17, n. 6, p. 509-14, Nov 2014. ISSN 1473-6519. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25111867> >.

DEHNE, N. et al. Cancer cell and macrophage cross-talk in the tumor microenvironment. **Curr Opin Pharmacol**, v. 35, p. 12-19, 08 2017. ISSN 1471-4973. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28538141> >.

DEMİNICE, 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. 2015-24, 08 2016. ISSN 1438-2199. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26781304> >.

_____. Resistance exercise prevents impaired homocysteine metabolism and hepatic redox capacity in Walker-256 tumor-bearing male Wistar rats. **Nutrition**, v. 32, n. 10,

p. 1153-8, Oct 2016. ISSN 1873-1244. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27288195> >.

DI SEBASTIANO, K. M. et al. Accelerated muscle and adipose tissue loss may predict survival in pancreatic cancer patients: the relationship with diabetes and anaemia. **Br J Nutr**, v. 109, n. 2, p. 302-12, Jan 2013. ISSN 1475-2662. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23021109> >.

DOEHNER, W.; ANKER, S. D. Cardiac cachexia in early literature: a review of research prior to Medline. **Int J Cardiol**, v. 85, n. 1, p. 7-14, Sep 2002. ISSN 0167-5273. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12163205> >.

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

DU, J. et al. Activation of caspase-3 is an initial step triggering accelerated muscle proteolysis in catabolic conditions. **J Clin Invest**, v. 113, n. 1, p. 115-23, Jan 2004. ISSN 0021-9738 (Print) 0021-9738.

EBNER, P.; VERSTEEG, G. A.; IKEDA, F. Ubiquitin enzymes in the regulation of immune responses. **Crit Rev Biochem Mol Biol**, v. 52, n. 4, p. 425-460, Aug 2017. ISSN 1549-7798. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28524749> >.

ESCAMILLA, D. M.; JARRETT, P. The impact of weight loss on patients with cancer. **Nurs Times**, v. 112, n. 11, p. 20-2, 2016 Mar 16-22 2016. ISSN 0954-7762. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27145674> >.

EVANS, W. J. et al. Cachexia: a new definition. **Clin Nutr**, v. 27, n. 6, p. 793-9, Dec 2008. ISSN 1532-1983. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18718696> >.

EZEOKE, C. C.; MORLEY, J. E. Pathophysiology of anorexia in the cancer cachexia syndrome. **J Cachexia Sarcopenia Muscle**, v. 6, n. 4, p. 287-302, Dec 2015. ISSN 2190-5991. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26675762> >.

FANZANI, A. et al. Molecular and cellular mechanisms of skeletal muscle atrophy: an update. **J Cachexia Sarcopenia Muscle**, v. 3, n. 3, p. 163-79, Sep 2012. ISSN 2190-6009. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22673968> >.

FARKAS, J. et al. Cachexia as a major public health problem: frequent, costly, and deadly. **J Cachexia Sarcopenia Muscle**, v. 4, n. 3, p. 173-8, Sep 2013. ISSN 2190-5991. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23539127> >.

FEARON, K.; ARENDS, J.; BARACOS, V. Understanding the mechanisms and treatment options in cancer cachexia. **Nat Rev Clin Oncol**, v. 10, n. 2, p. 90-9, Feb 2013. ISSN 1759-4782. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23207794> >.

_____. Understanding the mechanisms and treatment options in cancer cachexia. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 10, n. 2, p. 90-99, Feb 2013. ISSN 1759-4774. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000314859300008 > .

FEARON, K. et al. Definition and classification of cancer cachexia: an international consensus. **Lancet Oncol**, v. 12, n. 5, p. 489-95, May 2011. ISSN 1474-5488. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21296615> > .

FEARON, K. C. et al. Definition of cancer cachexia: effect of weight loss, reduced food intake, and systemic inflammation on functional status and prognosis. **Am J Clin Nutr**, v. 83, n. 6, p. 1345-50, Jun 2006. ISSN 0002-9165. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16762946> > .

FEARON, K. C. H. Cancer cachexia: Developing multimodal therapy for a multidimensional problem. **European Journal of Cancer**, v. 44, n. 8, p. 1124-1132, May 2008. ISSN 0959-8049. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000257092400009 > .

FRAJACOMO, F. T. et al. Aerobic Training Activates Interleukin 10 for Colon Anticarcinogenic Effects. **Med Sci Sports Exerc**, v. 47, n. 9, p. 1806-13, Sep 2015. ISSN 1530-0315. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25628174> > .

GALVÃO, D. A. et al. Changes in muscle, fat and bone mass after 36 weeks of maximal androgen blockade for prostate cancer. **BJU Int**, v. 102, n. 1, p. 44-7, Jul 2008. ISSN 1464-410X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18336606> > .

_____. Combined resistance and aerobic exercise program reverses muscle loss in men undergoing androgen suppression therapy for prostate cancer without bone metastases: a randomized controlled trial. **J Clin Oncol**, v. 28, n. 2, p. 340-7, Jan 2010. ISSN 1527-7755. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19949016> > .

GOMES, M. D. et al. Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 25, p. 14440-5, Dec 4 2001. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking).

GRIVENNIKOV, S. I.; GRETEN, F. R.; KARIN, M. Immunity, inflammation, and cancer. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 883-99, Mar 19 2010. ISSN 0092-8674.

GUARNIER, F. A. et al. Time course of skeletal muscle loss and oxidative stress in rats with Walker 256 solid tumor. **Muscle Nerve**, v. 42, n. 6, p. 950-8, Dec 2010. ISSN 1097-4598. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21104869> > .

HARA, K. et al. Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. **Cell**, v. 110, n. 2, p. 177-89, Jul 2002. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12150926> > .

HARDIE, D. G. AMP-activated protein kinase: a key system mediating metabolic responses to exercise. **Med Sci Sports Exerc**, v. 36, n. 1, p. 28-34, Jan 2004. ISSN 0195-9131 (Print) 0195-9131.

HOLZ, M. K. et al. mTOR and S6K1 mediate assembly of the translation preinitiation complex through dynamic protein interchange and ordered phosphorylation events. **Cell**, v. 123, n. 4, p. 569-80, Nov 2005. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16286006> >.

HORNBERGER, T. A.; FARRAR, R. P. Physiological hypertrophy of the FHL muscle following 8 weeks of progressive resistance exercise in the rat. **Can J Appl Physiol**, v. 29, n. 1, p. 16-31, Feb 2004. ISSN 1066-7814. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15001801> >.

HUI, L.; CHEN, Y. Tumor microenvironment: Sanctuary of the devil. **Cancer Lett**, v. 368, n. 1, p. 7-13, Nov 2015. ISSN 1872-7980. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26276713> >.

JIANG, W.; ZHU, Z.; THOMPSON, H. J. Dietary energy restriction modulates the activity of AMP-activated protein kinase, Akt, and mammalian target of rapamycin in mammary carcinomas, mammary gland, and liver. **Cancer Res**, v. 68, n. 13, p. 5492-9, Jul 2008. ISSN 1538-7445. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18593953> >.

KHAMOUI, A. V. et al. Aerobic and resistance training dependent skeletal muscle plasticity in the colon-26 murine model of cancer cachexia. **Metabolism**, v. 65, n. 5, p. 685-98, May 2016. ISSN 1532-8600. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27085776> >.

KIM, D. H. et al. mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. **Cell**, v. 110, n. 2, p. 163-75, Jul 2002. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12150925> >.

KIM, J.; BAE, J. S. Tumor-Associated Macrophages and Neutrophils in Tumor Microenvironment. **Mediators Inflamm**, v. 2016, p. 6058147, 2016. ISSN 1466-1861. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26966341> >.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-5, Aug 1970. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5432063> >.

LAGIRAND-CANTALOUBE, J. et al. The initiation factor eIF3-f is a major target for atrogin1/MAFbx function in skeletal muscle atrophy. **EMBO J**, v. 27, n. 8, p. 1266-76, Apr 2008. ISSN 1460-2075. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18354498> >.

LECKER, S. H.; GOLDBERG, A. L.; MITCH, W. E. Protein degradation by the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. **J Am Soc Nephrol**, v. 17, n. 7, p.

1807-19, Jul 2006. ISSN 1046-6673. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16738015> >.

LECKER, S. H. et al. Muscle protein breakdown and the critical role of the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. **J Nutr**, v. 129, n. 1S Suppl, p. 227S-237S, 01 1999. ISSN 0022-3166. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9915905> >.

LEGER, B. et al. Akt signalling through GSK-3beta, mTOR and Foxo1 is involved in human skeletal muscle hypertrophy and atrophy. **J Physiol**, v. 576, n. Pt 3, p. 923-33, Nov 1 2006. ISSN 0022-3751 (Print) 0022-3751.

LIN, W. W.; KARIN, M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. **J Clin Invest**, v. 117, n. 5, p. 1175-83, May 2007. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17476347> >.

LIRA, F. S.; NETO, J. C.; SEELAENDER, M. Exercise training as treatment in cancer cachexia. **Appl Physiol Nutr Metab**, v. 39, n. 6, p. 679-86, Jun 2014. ISSN 1715-5320. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24797380> >.

LOK, C. Cachexia: The last illness. **Nature**, v. 528, n. 7581, p. 182-3, Dec 2015. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26659165> >.

MACDOUGALL, J. D. et al. The time course for elevated muscle protein synthesis following heavy resistance exercise. **Can J Appl Physiol**, v. 20, n. 4, p. 480-6, Dec 1995. ISSN 1066-7814. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8563679> >.

MEKHAIL, K. et al. HIF activation by pH-dependent nucleolar sequestration of VHL. **Nat Cell Biol**, v. 6, n. 7, p. 642-7, Jul 2004. ISSN 1465-7392. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15181450> >.

MIYAZAKI, M.; NOGUCHI, M.; TAKEMASA, T. Intermittent reloading attenuates muscle atrophy through modulating Akt/mTOR pathway. **Med Sci Sports Exerc**, v. 40, n. 5, p. 848-55, May 2008. ISSN 0195-9131. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18408614> >.

MORENO-SANCHEZ, R. et al. Energy metabolism in tumor cells. **Febs j**, v. 274, n. 6, p. 1393-418, Mar 2007. ISSN 1742-464X (Print) 1742-464x.

OGASAWARA, R. et al. The role of mTOR signalling in the regulation of skeletal muscle mass in a rodent model of resistance exercise. **Sci Rep**, v. 6, p. 31142, 08 2016. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27502839> >.

OSTROWSKI, K. et al. Pro- and anti-inflammatory cytokine balance in strenuous exercise in humans. **J Physiol**, v. 515 (Pt 1), p. 287-91, Feb 1999. ISSN 0022-3751. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9925898> >.

PADILHA, C. S. et al. Resistance exercise attenuates skeletal muscle oxidative stress, systemic pro-inflammatory state, and cachexia in Walker-256 tumor-bearing rats. **Appl Physiol Nutr Metab**, v. 42, n. 9, p. 916-923, Sep 2017a. ISSN 1715-5320. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28475846> >.

_____. Evaluation of resistance training to improve muscular strength and body composition in cancer patients undergoing neoadjuvant and adjuvant therapy: a meta-analysis. **J Cancer Surviv**, v. 11, n. 3, p. 339-349, Jun 2017b. ISSN 1932-2267. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28054255> >.

_____. Resistance Exercise Counteracts Tumor Growth in Two Carcinoma Rodent Models. **Med Sci Sports Exerc**, Apr 2019. ISSN 1530-0315. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30985506> >.

PEDERSEN, B. K.; FEBBRAIO, M. A. Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6. **Physiol Rev**, v. 88, n. 4, p. 1379-406, Oct 2008. ISSN 0031-9333. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18923185> >.

_____. Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ. **Nat Rev Endocrinol**, v. 8, n. 8, p. 457-65, Aug 2012. ISSN 1759-5037. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22473333> >.

PENNA, F. et al. The Skeletal Muscle as an Active Player Against Cancer Cachexia. **Front Physiol**, v. 10, p. 41, 2019. ISSN 1664-042X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30833900> >.

_____. Anti-cytokine strategies for the treatment of cancer-related anorexia and cachexia. **Expert Opin Biol Ther**, v. 10, n. 8, p. 1241-50, Aug 2010. ISSN 1744-7682. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20594117> >.

PETERSEN, A. M.; PEDERSEN, B. K. The anti-inflammatory effect of exercise. **J Appl Physiol (1985)**, v. 98, n. 4, p. 1154-62, Apr 2005. ISSN 8750-7587 (Print) 0161-7567.

PETRUZZELLI, M.; WAGNER, E. F. Mechanisms of metabolic dysfunction in cancer-associated cachexia. **Genes Dev**, v. 30, n. 5, p. 489-501, Mar 2016. ISSN 1549-5477. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26944676> >.

REID, M. B. et al. Redox mechanisms of muscle dysfunction in inflammatory disease. **Physical Medicine and Rehabilitation Clinics of North America**, v. 16, n. 4, p. 925-949, 2005. Disponível em: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-26244468495&partnerID=40&md5=8d10b284f8f93e0f9e76450024443baf> >.

REID, M. B.; MOYLAN, J. S. Beyond atrophy: redox mechanisms of muscle dysfunction in chronic inflammatory disease. **J Physiol**, v. 589, n. Pt 9, p. 2171-9, May 2011. ISSN 1469-7793. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21320886> >.

RUIZ, J. R. et al. Muscular strength and adiposity as predictors of adulthood cancer mortality in men. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 18, n. 5, p. 1468-76, May

2009. ISSN 1055-9965. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19366909> >.

SAKAMOTO, K.; GOODYEAR, L. J. Invited review: intracellular signaling in contracting skeletal muscle. **J Appl Physiol** (1985), v. 93, n. 1, p. 369-83, Jul 2002. ISSN 8750-7587. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12070227> >.

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

SCHMITZ, K. H. et al. American College of Sports Medicine roundtable on exercise guidelines for cancer survivors. **Med Sci Sports Exerc**, v. 42, n. 7, p. 1409-26, Jul 2010. ISSN 1530-0315. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20559064> >.

SEELAENDER, M. et al. Inflammation in cancer cachexia: to resolve or not to resolve (is that the question?). **Clin Nutr**, v. 31, n. 4, p. 562-6, Aug 2012. ISSN 0261-5614.

SMITH, K. L.; TISDALE, M. J. Increased protein degradation and decreased protein synthesis in skeletal muscle during cancer cachexia. **Br J Cancer**, v. 67, n. 4, p. 680-5, Apr 1993. ISSN 0007-0920. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8471425> >.

TAN, B. H.; FEARON, K. C. Cachexia: prevalence and impact in medicine. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v. 11, n. 4, p. 400-7, Jul 2008. ISSN 1363-1950. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18541999> >.

TAZI, E.; ERRIHANI, H. Treatment of cachexia in oncology. **Indian J Palliat Care**, v. 16, n. 3, p. 129-37, Sep 2010. ISSN 0973-1075.

TEN BROEK, R. W.; GREFTE, S.; VON DEN HOFF, J. W. Regulatory factors and cell populations involved in skeletal muscle regeneration. **J Cell Physiol**, v. 224, n. 1, p. 7-16, Jul 2010. ISSN 1097-4652 (Electronic) 0021-9541 (Linking).

THOREEN, C. C. et al. An ATP-competitive mammalian target of rapamycin inhibitor reveals rapamycin-resistant functions of mTORC1. **J Biol Chem**, v. 284, n. 12, p. 8023-32, Mar 2009. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19150980> >.

TISDALE, M. J. Loss of skeletal muscle in cancer: biochemical mechanisms. **Front Biosci**, v. 6, p. D164-74, Feb 2001. ISSN 1093-9946. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11171557> >.

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

_____. Are tumoral factors responsible for host tissue wasting in cancer cachexia? **Future Oncol**, v. 6, n. 4, p. 503-13, Apr 2010a. ISSN 1744-8301. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20373865> >.

_____. Cancer cachexia. **Curr Opin Gastroenterol**, v. 26, n. 2, p. 146-51, Mar 2010b. ISSN 1531-7056 (Electronic) 0267-1379 (Linking).

VANDER HAAR, E. et al. Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40. **Nat Cell Biol**, v. 9, n. 3, p. 316-23, Mar 2007. ISSN 1465-7392. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17277771> >.

VON HAEHLING, S.; ANKER, S. D. Prevalence, incidence and clinical impact of cachexia: facts and numbers-update 2014. **J Cachexia Sarcopenia Muscle**, v. 5, n. 4, p. 261-3, Dec 2014. ISSN 2190-5991. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25384990> >.

WILLIAMS, A. et al. The expression of genes in the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway is increased in skeletal muscle from patients with cancer. **Surgery**, v. 126, n. 4, p. 744-9; discussion 749-50, Oct 1999. ISSN 0039-6060. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10520924> >.

WINTER, A.; MACADAMS, J.; CHEVALIER, S. Normal protein anabolic response to hyperaminoacidemia in insulin-resistant patients with lung cancer cachexia. **Clin Nutr**, v. 31, n. 5, p. 765-73, Oct 2012. ISSN 0261-5614.

WITKO-SARSAT, V. et al. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. **Kidney Int**, v. 49, n. 5, p. 1304-13, May 1996. ISSN 0085-2538. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8731095> >.

YUAN, L. et al. Muscle-specific E3 ubiquitin ligases are involved in muscle atrophy of cancer cachexia: an in vitro and in vivo study. **Oncol Rep**, v. 33, n. 5, p. 2261-8, May 2015. ISSN 1791-2431. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25760630> >.

APÊNCIDES

APÊNDICE A

Comitê de Ética em Experimentação Animal



Universidade
Estadual de Londrina

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 197/2015

Londrina, 08 de Outubro de 2015.

Prezado Pesquisador,

Certificamos que o projeto intitulado “Efeitos do exercício físico sobre a caquexia induzida por tumor Walker-256 em ratos e camundongos”, protocolo CEUA nº 9647.2015.12, sob a responsabilidade de **Rafael Deminice**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL), em reunião realizada em **25/08/2015**.

O projeto tem como objetivo investigar o efeito do treinamento com exercícios de força sobre a modulação da caquexia induzida pelo câncer através de marcadores de estresse oxidativo e inflamatórios, sinalizadores de síntese/degradação proteica e função mitocondrial em ratos e camundongos inoculados com tumor de Walker-256. Para isso será feito dois experimentos, cada um com 40 ratos e 40 camundongos. No experimento 1 os animais serão divididos em 4 grupos: grupo sem controle do tumor (C=10), grupo inoculado com 4.0×10^7 de células tumorais (T4=10), grupo inoculado com 2.5×10^7 de células tumorais (T2,5=10) e grupo inoculado com 1.0×10^7 de células tumorais (T1=10). No experimento 2 os grupos serão: grupo sem controle do tumor (C,n=10), grupo com tumor (T,=10), grupo exercitado sem tumor (E,=10) e grupo exercitado com tumor (ET,=10). A quantidade de células tumorais a serem inoculadas nos animais do grupo T e ET será baseada no experimento 1, onde o grupo que apresentar aumento do tamanho do tumor sem prejuízo para locomoção e realização do treinamento físico será utilizado. Ao final de 50 dias, tanto os animais do experimento 1 quanto os do experimento 2 serão submetidos à anestesia com ketamina/xilazina (120mg/kg i.m.) e sofrerão abertura da cavidade abdominal para punção pela aorta abdominal e coleta de sangue. O tumor será dissecado cuidadosamente para determinação do tamanho e índice de caquexia.

Vigência do Projeto	02/03/2015 a 02/03/2017
Espécie/linhagem	Camundongo isogênico - Swiss / Rato isogênico - Wistar
Nº de animais	80 camundongos e 80 ratos
Peso/Idade	5 semanas / 20g (camundongos) 100g (ratos)
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central da UEL
Amostras a serem coletadas	Sangue, músculos

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

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

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

Ilmo. Sr.

Prof. Dr. Rafael Deminice

Coordenador do Projeto

Departamento de Educação Física / Centro de Educação Física e Esporte

Com cópia para André Junior da Conceição (Chefe da DP-IC/PROPPG), Luiz Carlos Juliani (Diretor do Biotério Central da UEL) Chefe do Departamento de Educação Física e Diretor(a) do Centro de Educação Física e Esporte

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

LONDRINA - PARANÁ - BRASIL

Aug. 09580

ANEXOS

ANEXO A

Artigo 1 aceito para publicação: Efeito do protocolo de TR sobre os parâmetros tumorais

Medicine & Science in Sports & Exercise, Publish Ahead of Print DOI: 10.1249/MSS.0000000000002009

Resistance Exercise Counteracts Tumor Growth in Two Carcinoma Rodent Models

Camila S. Padilha¹, Mayra T. Testa¹, Poliana C. Marinello^{1,2}, Paola S. Cella¹, Fabrício A. Voltarelli^{1,3}, Fernando T. Frajacomo⁴, Rubens Cechini², José Alberto R. Duarte⁵, Flavia A. Guarnier², Rafael Deminice¹

¹State University of Londrina, Department of Physical Education, Londrina, PR, Brazil;

²State University of Londrina, Department of General Pathology, Londrina, PR, Brazil;

³Federal University of Mato Grosso, Graduate Program of Health Sciences, Faculty of Medicine, Cuiabá, Brazil; ⁴Brazilian National Institute of Cancer, Rio de Janeiro, RJ,

Brazil; ⁵University of Porto, CIAFEL, Faculty of Sport, Porto, Portugal

Camila S. Padilha and Mayra T. Testa contributed equally to this work.

Corresponding Author: Rafael Deminice, Department of Physical Education, Faculty of Physical Education and Sport - State University of Londrina. Rodovia Celso Garcia Cid | Pr 445 Km 380 | Campus Universitário, Londrina, Paraná, Brazil. Phone: 05543 36024564, e-mail: rdeminice@uel.br.

This study was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brazil (CAPES) # PVE #88881.068035/2014-01 and Fundação Araucária Conv. # 174-2014. The authors declare that they have no competing interests. The authors also declare that the results of the study are presented clearly, honestly, and without fabrication, falsification, or inappropriate data manipulation. The results of the present study do not constitute endorsement by American College of Sports Medicine.

ANEXO B

Artigo 2 em preparação: Efeito do protocolo de TR na atenuação da atrofia muscular

Contribution of AKT-mTOR signaling pathway on attenuation of wasting muscle induced by resistance training in Walker-256 tumor-bearing rats.

Running title: Resistance training and AKT-mTOR signaling pathway contribution of wasting muscle in cancer cachexia.

Camila S. Padilha¹, Patricia Chimin¹, Fabrício A. Voltarelli², Paola S. Cella¹, Mayra T. Testa¹, Poliana C. Marinello^{1,4}, Philippe B. Guirro¹, José A. R. Duarte³, Rubens Cecchini⁴, Flávia A. Guarnier⁴, Rafael Deminice¹.

1. Laboratory of Exercise Biochemistry, State University of Londrina, Paraná-Londrina, Brazil.
2. Federal University of Mato Grosso, Cuibá, MT, Brazil.
3. CIAFEL, Faculty of Sport, University of Porto, Porto, Portugal.
4. Department of General Pathology, State University of Londrina, Paraná-Londrina, Brazil.

* **Corresponding Author:** Camila S. Padilha, Department of Physical Education, Faculty of Physical Education and Sport - State University of Londrina. Rodovia Celso Garcia Cid | Pr 445 Km 380 | Campus Universitário, Londrina, Paraná, Brasil.

e-mail: camilapadilha@uel.br

ORCID: 0000-0002-4160-5650

Research ID: Q-3523-2017