UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE EDUCAÇÃO FÍSICA E ESPORTE

Caquexia do câncer: potencial terapêutico do treinamento físico aeróbio sobre o
músculo esquelético

Christiano Robles Rodrigues Alves

São Paulo

2017

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE EDUCAÇÃO FÍSICA E ESPORTE

Caquexia do câncer: potencial terapêutico do treinamento físico aeróbio sobre o
músculo esquelético

Christiano Robles Rodrigues Alves

São Paulo

2017

CHRISTIANO ROBLES RODRIGUES ALVES

Caquexia do câncer: potencial terapêutico do treinamento físico aeróbio sobre o
músculo esquelético

Tese apresentada à Escola de Educação Física
e Esporte da Universidade de São Paulo, como
requisito parcial para a obtenção do título de
Doutor em Ciências

Área de Concentração: Estudos Biodinâmicos
da Educação Física e Esporte

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Patricia Chakur Brum

São Paulo

2017

FOLHA DE APROVAÇÃO

Autor: ALVES, Christiano Robles Rodrigues

Título: Caquexia do câncer: potencial terapêutico do treinamento físico aeróbio sobre o músculo esquelético

Tese apresentada à Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro durante todo o processo (16/01478-0, 14/03016-8, 12/25240-1 e 12/02528-0).

À Profa. Dra. Patricia Chakur Brum, por me receber em seu laboratório e sempre acrescentar muito para o meu crescimento profissional e pessoal. Agradeço pela orientação durante todo o processo do doutorado e pelo constante empenho para desenvolver nossa área de atuação, seja como pesquisadora, comunicadora ou mentora.

Aos meus colegas do Laboratório de Fisiologia Celular e Molecular do Exercício da EEFE-USP. Agradeço pelas discussões enriquecedoras do cotidiano e pela dedicação em cada experimento realizado. Obrigado a todos pela aprendizagem proporcionada!

Aos colaboradores de diferentes laboratórios em São Paulo que foram fundamentais para a realização desse estudo e/ou para o início de novos projetos nessa mesma temática. INCOR FMUSP: Prof. Dr. Carlos Eduardo Negrão; ICESP FMUSP: Prof. Dr. Roger Chammas, Dr. Doutor Gilberto de Castro Jr, Marcelo V. Negrão, Dra. Daniele de P. Faria, Camila de G. Carneiro, Alexandre T. Garcez e Dra. Camila M. Melo; ICB-USP: Prof. Dr. Niels O. S. Câmara; Instituto Butantan: Dra. Yara Cury e Dra. Vanessa P. Gutierrez; e Hospital Sírio-Libanês: Dra. Anamaria A. Camargo e Dr. Pedro A. Galante.

Ao Prof. Dr. Ulrik Wisløff e ao Prof. Dr. Geir Slupphaug pela supervisão durante o período de intercâmbio na NTNU em 2013. Agradeço também a todos os meus colegas da Noruega que me ajudaram e compartilharam ótimos momentos durante esse período de intercâmbio. Serei eternamente grato a todos envolvidos nesse processo.

Ao Prof. Dr. Jorge L. Ruas pela colaboração e por me receber para um estágio em seu laboratório no *Karolinska Institutet* na Suécia em 2015.

À Profa. Dra. Laurie J. Goodyear, pela supervisão no período de intercâmbio na *Harvard Medical School* em 2016 e aos meus colegas de Boston pelas intermináveis discussões filosóficas fundamentais para renovar as energias nas últimas etapas do doutorado.

À minha família. Sobretudo, à minha mãe e ao meu pai por serem os principais responsáveis pela minha criação e educação. E à minha namorada, Lilian Cruz, que apareceu para dar um sentido na minha vida. Agradeço pelo companheirismo, dedicação e paciência.

Por fim, agradeço à EEFE-USP, onde fiz minha graduação (2008-2011) e doutorado (2012-2017). Muito obrigado aos inúmeros alunos, funcionários e docentes pela aprendizagem proporcionada durante esses nove anos convivendo na EEFE-USP.

"Exercise is not magic. It is series of chemical reactions involving muscle"

Bruce Spiegelman

JCI's Conversations with Giants in Medicine (2013)

RESUMO

ALVES, CHRISTIANO ROBLES RODRIGUES. **Caquexia do câncer: potencial terapêutico do treinamento físico aeróbico sobre o músculo esquelético**. 2017. 137 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Educação Física e Esporte, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2017.

A caquexia do câncer é uma síndrome multifatorial cuja principal característica é a atrofia do músculo esquelético, resultando na progressiva incapacidade funcional do paciente. Essa síndrome está diretamente associada a uma redução da tolerância ao esforço físico e uma menor sobrevida em pacientes com câncer. O tratamento farmacológico para a caquexia ainda é muito limitado, possivelmente devido à característica multifatorial dessa síndrome. Nesse sentido, as evidências indicam que uma abordagem multimodal é necessária para atenuar a caquexia, incluindo estratégias não-farmacológicas como o treinamento físico. Contudo, os mecanismos envolvidos nos efeitos terapêuticos do treinamento físico sobre a caquexia do câncer ainda foram pouco explorados. Portanto, esse estudo teve como objetivo central avaliar os efeitos do treinamento físico aeróbico sobre a disfunção do metabolismo energético e a atrofia muscular em modelos experimentais de caquexia do câncer, além de explorar os mecanismos envolvidos nos possíveis efeitos terapêuticos do treinamento físico. Para isso, inicialmente padronizamos um modelo de caquexia em ratos utilizando injeção de células tumorais Walker 256 na medula óssea. Esse modelo apresentou consistente crescimento tumoral e atrofia muscular. Avaliamos sobre esse modelo os efeitos de dois protocolos diferentes de treinamento físico aeróbico, a saber: treinamento físico aeróbico contínuo em intensidade moderada (MIT, do inglês *moderate intensity training*) e o treinamento físico intervalado em alta intensidade (HIIT, do inglês *high-intensity interval training*). Embora não tenham sido observados efeitos sobre o crescimento tumoral, o MIT e o HIIT melhoraram a capacidade aeróbia e aumentaram a sobrevida dos animais, sugerindo que o treinamento físico aeróbico induz efeitos benéficos durante a progressão da caquexia do câncer. De fato, o HIIT normalizou marcadores de estresse oxidativo e reestabeleceu a função do músculo esquelético. Com o intuito de explorar mecanismos responsáveis por esses benefícios, realizamos uma análise proteômica de larga escala no músculo esquelético de ratos controle, do modelo Walker e do modelo Walker submetido ao HIIT. Nessa análise identificamos a *COP9 signalosome complex subunit 2/Thyroid receptor interacting protein 15* (COPS2/TRIP15) como uma das principais proteínas alteradas, estando o seu conteúdo reduzido no músculo esquelético de ratos com caquexia e normalizado após a realização do HIIT. Resultados similares foram observados em outro modelo experimental de câncer (B16F10 em camundongos) submetido ou não ao HIIT. Na próxima etapa buscamos avaliar se a COPS2/TRIP15 poderia apresentar um papel terapêutico no músculo esquelético. Para isso, realizamos a superexpressão dessa proteína em miotubos primários de camundongos. Os miotubos foram incubados com meio de cultura previamente condicionado em células tumorais por 48 horas para induzir disfunção do metabolismo e perda de conteúdo proteico. Contudo, a superexpressão da COPS2/TRIP15 nos miotubos não foi suficiente para impedir os efeitos induzidos pelo meio condicionado. Em suma, essa tese de doutorado demonstrou que o HIIT foi capaz de atenuar a intolerância ao esforço físico e normalizar o conteúdo de COPS2/TRIP15 no músculo esquelético em diferentes modelos experimentais de caquexia do câncer. Esses resultados pré-clínicos abrem perspectivas de avaliar os efeitos do HIIT em pacientes com caquexia do câncer. Novos experimentos são necessários para entender a função da COPS2/TRIP15 no músculo esquelético durante a progressão da caquexia.

Palavras-chave: Exercício; Treinamento físico aeróbico; Câncer; Caquexia; Atrofia muscular.

ABSTRACT

ALVES, CHRISTIANO ROBLES RODRIGUES. Cancer cachexia: potential therapeutic effects of aerobic exercise training on skeletal muscle. 2017. 137 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Educação Física e Esporte, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2017.

Cancer cachexia is a multifactorial syndrome characterized by skeletal muscle wasting, resulting in a functional impairment. This syndrome is associated with exercise intolerance and early mortality in cancer patients. Pharmacological treatment is still limited, perhaps due to the multifactorial characteristics of this syndrome. In this sense, evidences indicate that a multimodal approach is necessary to counteract cachexia, including non-pharmacological strategies, such as exercise training. However, little is known regarding the mechanisms underlying the potential therapeutic effects of exercise training on cancer cachexia. Therefore, the current study aimed to evaluate the effects of aerobic exercise training on metabolic impairment and skeletal muscle wasting in cancer cachexia experimental models. Additionally, we aimed to explore mechanisms involving the potential therapeutic effects of exercise training. For doing that, we first standardized a cancer cachexia rat model by injecting Walker 256 tumor cells in the bone marrow. This model displayed consistent tumor growth, skeletal muscle wasting and good reproducibility. By using this experimental model, we assessed the effects of two different aerobic exercise training protocols: moderate intensity training (MIT) and high-intensity interval training (HIIT). Even though tumor growth was not affected, both MIT and HIIT improved aerobic capacity and survival. Moreover, HIIT reestablished the skeletal muscle function and normalized oxidative stress markers. To further explore mechanisms underlying such benefits, we applied a proteomics screening in the skeletal muscle of 1) control rats, 2) rats with cancer cachexia and 3) rats with cancer cachexia submitted to HIIT. In this analysis, we identified COP9 signalosome complex subunit 2/Thyroid receptor interacting protein 15 (COPS2/TRIP15) as one of the most regulated proteins, showing lower content in the skeletal muscle during cancer cachexia progression, which was normalized after HIIT. Similar results were observed for B16F10 model in mice submitted or not to HIIT. We further assessed whether COPS2/TRIP15 could present a therapeutic role in the skeletal muscle. For doing that, we overexpressed this protein in primary mouse myotubes using an adenovirus. Cell culture media taken from tumor cells were incubated in the myotubes to induce metabolism impairment and loss of protein content. However, COPS2/TRIP15 overexpression was not sufficient to mitigate deleterious effects induced by the conditioned media. In summary, the current PhD thesis demonstrated that HIIT mitigated exercise intolerance and normalized COPS2/TRIP15 protein content in the skeletal muscle of different cancer cachexia experimental models. These pre-clinical data open perspectives to evaluate HIIT effects in cancer cachexia patients. New experiments are necessary to explore the role of COPS2/TRIP15 during cancer cachexia progression.

Keywords: Exercise; Aerobic exercise training; Cancer; Cachexia; Muscle atrophy.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Caquexia induzida pelo câncer	1
1.2. Turnover proteico na caquexia induzida pelo câncer	6
1.3. Metabolismo energético na caquexia induzida pelo câncer	8
1.4. Tratamentos atuais para a caquexia	10
1.5. Treinamento físico aeróbio como um tratamento para a caquexia	11
1.6. Modelos experimentais de caquexia induzida pelo câncer	14
2. OBJETIVOS	17
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
3.1. A injeção de células tumorais Walker 256 na medula óssea induz caquexia em ratos	18
3.2. O treinamento físico aeróbio aumenta a tolerância ao esforço físico e a sobrevida no modelo Walker	24
3.3. O treinamento físico aeróbio não atenua a atrofia muscular, mas reverte parcialmente a disfunção do metabolismo aeróbio e o estresse oxidativo no modelo Walker	28
3.4. O HIIT não interfere na progressão tumoral, mas restaura a função do músculo esquelético no modelo Walker	42
3.5. O HIIT apresenta benefícios em outros modelos de câncer como o B16F10 e o LLC em camundongos	50
3.6. Uma análise proteômica de larga escala indica a COPS2/TRIP15 como uma das principais proteínas alteradas no músculo esquelético durante a progressão da caquexia, porém o HIIT normaliza essa alteração	54
3.7. A seleção de clones únicos é uma estratégia eficaz para obter linhagens que induzem ou não caquexia <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	60
3.8. A superexpressão de COPS2/TRIP15 não protege miotubos dos efeitos deletérios do câncer <i>in vitro</i>	65
4. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	69
5. MATERIAL E MÉTODOS	70
5.1. Amostra e aprovação no Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)	70
5.2. Obtenção, manutenção e injeção das células Walker 256 em ratos	70
5.3. Obtenção, manutenção e injeção das células B16F10 e LLC em camundongos	71
5.4. Protocolos de treinamento físico aeróbio	71
5.5. Avaliação do desenvolvimento tumoral	72
5.6. Avaliação da sobrevida	74

5.7. Avaliação da massa corporal e do consumo alimentar	74
5.8. Avaliação de hiperalgesia	75
5.9. Avaliação da tolerância ao esforço físico e consumo de oxigênio	75
5.10. Teste de deambulação	75
5.11. Avaliação da atividade física espontânea	76
5.12. Análise das concentrações séricas de citocinas pró e/ou anti-inflamatórias	76
5.13. Análise das concentrações plasmáticas de glicose	77
5.14. Análise das concentrações plasmáticas de lactato	77
5.15. Análise de parâmetros morfológicos do músculo esquelético	78
5.16. Análise da função do músculo esquelético <i>ex vivo</i>	79
5.17. Análise da atividade da enzima citrato sintase no músculo esquelético	80
5.18. Análise de marcadores de estresse oxidativo no músculo esquelético	80
5.19. Análise da atividade do proteassoma no sítio quimiotripsina no músculo esquelético	83
5.20. Análises do conteúdo de mRNAs no músculo esquelético	83
5.21. Análises do conteúdo proteico no músculo esquelético	84
5.22. Proteômica redox	85
5.23. Proteômica <i>gel-free</i> e <i>label-free</i>	87
5.24. Ensaios <i>in vitro</i> em miotubos primários de camundongos	87
5.25. Análise estatística dos resultados	89
REFERÊNCIAS	90
ANEXOS	98

1. INTRODUÇÃO

1.1. Caquexia induzida pelo câncer

O câncer é a principal causa de morte na maioria dos países desenvolvidos e a segunda maior causa de morte nos países em desenvolvimento. Estima-se que 12,7 milhões de casos de câncer tenham sido diagnosticados no ano de 2008 e, como consequência, 7,6 milhões de mortes tenham ocorrido naquele ano (JEMAL et al., 2011). Embora nas últimas duas décadas seja notório o progresso na detecção, no diagnóstico e no tratamento do câncer (MCCORKLE et al., 2011), as estimativas indicam que milhões de novos casos e mortes ocorrerão nos próximos anos (JEMAL A, BRAY F, CENTER MM, FERLAY J, WARD E, 2011; SIEGEL et al., 2011, 2014). Nesse sentido, cerca de 80% dos pacientes com câncer em estados avançados apresentam caquexia e mais de 25% das mortes induzida pelo câncer é consequência direta da caquexia (TISDALE, 2010). De fato, a caquexia está diretamente relacionada a uma redução da tolerância ao esforço físico (MOSES et al., 2004), uma redução da tolerância aos tratamentos do câncer (BACHMANN et al., 2008) e uma menor sobrevida dos pacientes (FEARON; VOSS; HUSTEAD, 2006; VAN EYS, 1985). Diante desse quadro, alguns dos principais pesquisadores da área se reuniram para propor uma clara definição, os parâmetros que devem ser considerados no diagnóstico e as possibilidades de tratamento existentes para a caquexia induzida pelo câncer (FEARON et al., 2011a). Cabe ressaltar que a Associação Brasileira de Cuidados Paliativos adotou os mesmos critérios para a população brasileira (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CUIDADOS PALIATIVOS, 2011).

Esse consenso define a caquexia como uma síndrome multifatorial caracterizada pela perda de massa da musculatura esquelética (com ou sem perda de massa gorda) que não pode ser revertida por suporte nutricional convencional e que resulta na progressiva incapacidade funcional (FEARON et al., 2011a). Mais especificamente, a severidade dessa síndrome apresenta três estágios. No primeiro estágio (pré-caquexia), a variável clínica mais notória é uma perda de massa corporal de até 5% devido a fatores como, por exemplo, a anorexia e a resistência à insulina. O segundo estágio (caquexia) é caracterizado por pacientes que apresentam perda de massa corporal superior a 5% nos últimos seis meses, ou perda de massa corporal acima de 2% associada a um índice de massa corpórea (IMC) inferior a 20, ou perda de massa corporal acima de 2% associada à sarcopenia. Cabe salientar que diversos fatores são determinantes para o paciente evoluir ou não da pré-caquexia para a caquexia, como, por exemplo, o tipo e a localização do tumor, o tipo de tratamento aplicado e a resposta inflamatória do organismo. Por fim, o terceiro estágio (caquexia refratária) é consequência do câncer muito avançado, no qual os pacientes não respondem aos tratamentos e, portanto, está

associado a um catabolismo exacerbado do organismo e uma expectativa de vida inferior a três meses (FEARON et al., 2011a). A Figura 1 ilustra a progressão da caquexia.

Figura 1. Indicativos clínicos da progressão da caquexia do câncer segundo o último consenso publicado no *Lancet Oncol* em 2011 (FEARON et al., 2011a).

Embora a perda de massa gorda também possa contribuir para a redução da massa corporal em pacientes caquéticos, a perda de massa muscular (atrofia muscular) é o principal fator responsável pela intolerância aos esforços físicos do cotidiano, contribuindo para redução da qualidade de vida e, em última instância, para a redução da sobrevida (ACHARYYA et al., 2005; VAN EYS, 1985). A atrofia muscular nos pacientes caquéticos é progressiva, podendo chegar a uma perda de até 75% da massa muscular e, consequentemente, fadiga extrema e imobilidade (TISDALE, 2009, 2010). Cabe ressaltar que a atrofia muscular é resultado de um desbalanço no *turnover* proteico devido à exacerbada ativação de sistemas proteolíticos, como o sistema lisossomal/autofágico (autofagia) e o sistema ubiquitina-proteassoma (SUP) (LECKER et al., 2004; SCHIAFFINO et al., 2013), associadas a redução de vias de síntese proteica, como o eixo IGF1/AKT/mTOR (*insulin-like growth factor 1/Protein kinase B/mammalian target of rapamycin*) (SCHIAFFINO et al., 2013), na musculatura esquelética. São diversos os mediadores envolvidos na hiperativação desses sistemas proteolíticos ou na inibição de vias de síntese proteica, caracterizando a

caquexia como uma síndrome multifatorial (FEARON; GLASS; GUTTRIDGE, 2012; JOHNS; STEPHENS; FEARON, 2013).

Dentre esses fatores, destacam-se a anorexia (ARGILÉS; ALVAREZ; LÓPEZ-SORIANO, 1997; LAVIANO et al., 2008), a resistência à insulina (AGUSTSSON et al., 2011; LUNDHOLM et al., 2007), o estresse oxidativo exacerbado (GUARNIER et al., 2010; MARIN-CORRAL et al., 2010), o aumento da produção de proteínas da família *transforming growth factor β* (TGF β) (e.g. Miostatina e Activina A) (ZHOU et al., 2010), o hipogonadismo (BARACOS et al., 2010; SKIPWORTH et al., 2011), a hiperativação adrenérgica (HYLTANDER et al., 1991) e, principalmente, a inflamação sistêmica (ARGILÉS; BUSQUETS; LÓPEZ-SORIANO, 2011; FEARON; GLASS; GUTTRIDGE, 2012; GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2010; JOHNS; STEPHENS; FEARON, 2013; TISDALE, 2010). De fato, citocinas pró-inflamatórias como o *tumor necrosis factor α* (TNF- α) (REID; LI, 2001) e seu análogo *TNF-related weak inducer of apoptosis* (TWEK) (MITTAL et al., 2010), a interleucina-6 (IL-6) (KURODA et al., 2007; MOSES et al., 2009) e a interleucina-1 β (IL-1 β) (ARGILÉS et al., 2012; ARGILÉS; BUSQUETS; LÓPEZ-SORIANO, 2011) podem ser secretadas por componentes do sistema imune e pelo tecido adiposo (via ativação de *lipid-mobilizing factor*) em resposta a presença do tumor (ARGILÉS et al., 2014; FEARON; GLASS; GUTTRIDGE, 2012). Além disso, a secreção de outros fatores específicos do tumor como o *proteolysis-inducing factor* (PIF) (TODOROV; FIELD; TISDALE, 1999), também devem ser considerados. Em suma, esses mediadores podem ativar fatores de transcrição, como o *nuclear factor kappa B* (NF κ B) (LADNER; CALIGIURI; GUTTRIDGE, 2003), *Forkhead box O3a* (FOXO3a) (ZHOU et al., 2010), *Signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3) e *Activator protein 1* (AP-1) (FEARON; GLASS; GUTTRIDGE, 2012); ou inibir o *peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator-1 α* (PGC-1 α), um co-fator de transcrição envolvido na biogênese mitocondrial (CHINSOMBOON et al., 2009; WANG et al., 2012). Diante do exposto, a caquexia se torna um cenário pouco atrativo para a aplicação de monoterapias farmacológicas.

Os mediadores mencionados acima também podem resultar em uma disfunção do metabolismo energético muscular devido a um menor conteúdo mitocondrial e/ou menor capacidade de fosforilação oxidativa das mitocôndrias (FERMOSELLE et al., 2013). Em contrapartida, o organismo encontra-se com o metabolismo exacerbado devido a demanda competitiva no suprimento de substratos energéticos para o organismo e o tumor. Considerando que o tumor utiliza predominantemente a via glicolítica como fonte de energia mesmo em situações cuja oferta de oxigênio é adequada, este produz lactato em excesso que

será metabolizado pelo fígado para ressintetizar glicose (ciclo de Cori). Assim, a glicose será ofertada para o crescimento e desenvolvimento do tumor (HOLROYDE et al., 1975; TISDALE, 2009). Em relação ao músculo esquelético, a exacerbada degradação proteica oferece aminoácidos para o fígado que também pode ressintetizar glicose a ser transportada ao tumor (TISDALE, 2009).

Além disso, um dos importantes mecanismos associados ao estado hipermetabólico na caquexia induzida pelo câncer é a maior expressão de proteínas mitocondriais desacopladoras (*uncoupling proteins*; UCPs) (FEARON; GLASS; GUTTRIDGE, 2012). De fato, os níveis de mRNA da UCP-3 estão elevados no músculo esquelético em pacientes com caquexia do câncer quando comparados a sujeitos saudáveis ou pacientes com câncer que não apresentam caquexia (COLLINS et al., 2002). Como resultado direto dessa disfunção mitocondrial, o músculo esquelético passa a produzir mais espécies reativas de oxigênio (EROs) levando a um quadro de estresse oxidativo exacerbado (DER-TOROSSIAN et al., 2013). O estresse oxidativo pode sinalizar (diretamente ou via inflamação) a ativação das vias proteolíticas, como o SUP (KRIEGENBURG et al., 2011; SHANG; TAYLOR, 2011), resultando em um ciclo vicioso.

Considerando que a caquexia induzida pelo câncer é uma síndrome multifatorial complexa, elaboramos uma figura ilustrativa (Figura 2) com o intuito de facilitar o entendimento da integração dos mediadores mencionados nessa seção. Nas próximas seções serão detalhados os principais sistemas proteolíticos responsáveis pelo desbalanço no *turnover* proteico e as alterações do metabolismo energético na musculatura esquelética. Posteriormente, realizaremos uma análise crítica dos tratamentos existentes para a caquexia com ênfase nos possíveis efeitos terapêuticos do treinamento físico aeróbio. Por fim, descreveremos sobre os principais modelos animais utilizados para estudar a caquexia induzida pelo câncer.

Figura 2. Ilustração dos mediadores envolvidos na atrofia e na disfunção do metabolismo energético na caquexia induzida pelo câncer. SNC: sistema nervoso central. SUP: ubiquitina-proteassoma. EROs: espécies reativas de oxigênio. FT: fatores de transcrição.

1.2. *Turnover* proteico na caquexia induzida pelo câncer

Quando a taxa de degradação é superior à de síntese proteica, o organismo apresenta um desbalanço no *turnover* proteico. No caso da caquexia induzida pelo câncer, isso parece ocorrer por dois processos: diminuição da síntese e aumento da degradação proteica (GLASS, 2010; TISDALE, 2009, 2010). De fato, o estudo de Smith e Tisdale (1993) foi o primeiro a demonstrar que a síntese proteica se encontra diminuída no músculo esquelético em modelo animal de câncer. Os autores utilizaram o método de incorporação de fenilalanina ao músculo gastrocnêmio para avaliar a taxa de síntese em camundongos com caquexia induzida pelo adenocarcinoma MAC-16. Uma diminuição de 60% foi observada na taxa de síntese proteica nos animais que apresentaram perda de peso superior a 15% (SMITH; TISDALE, 1993). Posteriormente, outros estudos comprovaram essa redução, cabendo destacar que a taxa de diminuição da síntese pode variar dependendo de cada modelo experimental ou de cada paciente e do estágio da caquexia (JOHNS; STEPHENS; FEARON, 2013). Nesse contexto, grande atenção é dada à via de síntese IGF1/AKT/mTOR que está diminuída em diversas doenças sistêmicas, incluindo a caquexia do câncer (SCHIAFFINO et al., 2013).

Quanto à degradação proteica, embora ela seja essencial para a manutenção da proteostase, um aumento exacerbado piora o prognóstico do paciente (LECKER et al., 1999). Dois principais sistemas proteolíticos parecem estar envolvidos em condições de atrofia muscular, a saber: o SUP e o sistema lisossomal/autofágico. Cabe ressaltar que grande atenção é dada ao SUP, uma vez que estudos com ratos e humanos demonstraram que esse sistema é responsável por mais de 80% da degradação de proteínas intracelulares (GLICKMAN; CIECHANOVER, 2002; LECKER et al., 1999). Dentre as inúmeras funções que o SUP exerce no organismo, podemos destacar a degradação de proteínas miofibrilares e proteínas mal enoveladas ou com a função biológica comprometida. Contudo, sua alta atividade em estados catabólicos, como o câncer, parece ser um dos principais responsáveis por desencadear a atrofia muscular (WILLIAMS et al., 1999). O SUP é um sistema altamente complexo, realizando um processo de marcação e degradação de proteínas alvo (GLICKMAN; CIECHANOVER, 2002). Algumas enzimas apresentam funções fundamentais na operacionalização desse sistema. Como ilustrado na Figura 3, as enzimas conhecidas como E1 ativam a ubiquitina utilizando uma molécula de ATP. Em seguida, as E2 conjugam as ubiquitinas em cadeias de poliubiquitinas (JENTSCH, 1992). Posteriormente, as E3 (proteína ligase) ligam as cadeias de poliubiquitinas conjugadas à proteína alvo. Finalmente, o proteassoma reconhece essa proteína marcada e a degrada em pequenos peptídeos

(GLICKMAN; CIECHANOVER, 2002). Cabe destacar que o entendimento de como funciona o SUP culminou no prêmio Nobel de química de 2004 para os pesquisadores Hershko, Rose e Ciechanover.

Diante desse quadro, o termo “atrogenes” foi cunhado para a identificação coletiva de genes que codificam a marcação para a subsequente degradação de proteínas miofibrilares pelo complexo enzimático proteassoma (LECKER et al., 2004). Os principais “atrogenes” expressos no músculo esquelético são a Atrogin-1 (também conhecida como *Muscle Atrophy F-box*) e a MuRF1 (*muscle RING finger protein*) (BODINE et al., 2001; GOMES et al., 2001), duas E3 ligases que exercem função essencial na degradação das proteínas musculares (CLARKE et al., 2007; LAGIRAND-CANTALOUBE et al., 2008; TISDALE, 2010). Após o processo de marcação das proteínas-alvo, o proteassoma 26S degrada-as em peptídeos a partir do reconhecimento da cauda de poliubiquitinas pela porção 19S e degradação propriamente dita pelo centro catalítico, a porção 20S (LECKER et al., 2004).

Figura 3. Esquema ilustrativo da ativação do sistema ubiquitina-proteassoma (SUP) para degradar uma proteína alvo. Ub: ubiquitina. ATP: adenosina trifosfato.

Lecker et al. (2004) ainda demonstraram que a atrofia muscular induzida por diferentes modelos de doenças crônicas degenerativas, incluindo o câncer, apresenta uma maior expressão de atrogenes envolvidos diretamente no sistema lisossomal/autofágico, a saber: MAP1LC3B, GABARAPL1, BNIP3 e CTS1 (LECKER et al., 2004). Diferente do SUP, não havia muito interesse em avaliar a contribuição da proteólise lisossomal em quadros

de atrofia até há pouco tempo, uma vez que este é responsável pela degradação de apenas uma pequena parte das proteínas musculares. Entretanto, estudos recentes demonstraram que o funcionamento adequado desse sistema é essencial para a manutenção do metabolismo muscular que consequentemente afeta a proteostase muscular (SANDRI, 2013; SANDRI et al., 2013). Em diversos estados catabólicos ocorre, por exemplo, um aumento da expressão gênica de CTSL1, o qual codifica a Catepsina L, uma importante protease lisossomal na musculatura esquelética (LECKER et al., 2004; SANDRI et al., 2013).

Como exposto acima, a hiperativação do SUP e do sistema lisossomal/autofágico resulta no estado catabólico observado na caquexia. Dentre os fatores que participam na hiperativação desse sistema, destacamos a disfunção metabólica que será descrita a seguir.

1.3. Metabolismo energético na caquexia induzida pelo câncer

É bem estabelecido que diversas funções celulares são mantidas pela energia química gerada na hidrólise da adenosina trifosfato (ATP), sendo a capacidade de ressintetizar moléculas de ATP fundamental para manter as funções celulares do músculo esquelético. As fibras musculares podem sintetizar moléculas de ATP pelo metabolismo aeróbio (oxidativo) ou anaeróbio. Enquanto a síntese pelo metabolismo anaeróbio (degradação da fosforilcreatina ou do glicogênio muscular) é essencial para atividades de alta intensidade e curta duração (MEDBØ; TABATA, 1993), a síntese pelo metabolismo aeróbio é essencial nas atividades do cotidiano ou durante a realização de esforços físicos de longa duração. A mitocôndria é a organela central do metabolismo aeróbio, sendo essencial para os processos de beta-oxidação, o Ciclo de Krebs e a fosforilação oxidativa (MITCHELL; MOYLE, 1967).

Nesse contexto, a disfunção mitocondrial tem sido reportada em diversas doenças sistêmicas envolvidas no processo de atrofia muscular, incluindo a caquexia induzida pelo câncer (ARIA TZIKA et al., 2013; CONSTANTINO et al., 2011; FERMOSELLE et al., 2013). Recentemente, Fermoselle et al., 2013 demonstraram um menor consumo de oxigênio e uma menor atividade dos complexos I, II e IV da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial nos músculos *gastrocnemius* e diafragma em camundongos com caquexia induzida pela injeção das células tumorais LP07 nos pulmões (FERMOSELLE et al., 2013). Além disso, Tzika et al. (2013) submeteram camundongos C57B1/6 com carcinoma pulmonar de Lewis (LLC, do inglês *Lewis Lung Carcinoma*) a um ensaio *in vivo* de ressonância magnética nuclear para avaliar a taxa de síntese de ATP e do fluxo do ciclo de Krebs. Os pesquisadores também avaliaram a morfologia mitocondrial no músculo *gastrocnemius* desses animais por microscopia eletrônica. Os resultados demonstraram menor taxa de síntese de

ATP e menor fluxo do ciclo de Krebs associados a uma menor densidade e maior índice de desacoplamento mitocondrial (ARIA TZIKA et al., 2013). No mesmo modelo experimental, Constantinou et al., 2011 também observou menor taxa de síntese de ATP associada a diferenças na expressão de genes mitocondriais no músculo *gastrocnemius*, incluindo um aumento da UCP-3, quando comparados a camundongos saudáveis (CONSTANTINO et al., 2011). Corroborando esses achados em modelo animal, os níveis de mRNA da UCP-3 estavam elevados no músculo esquelético em pacientes com caquexia induzida pelo câncer gastrointestinal quando comparados a pacientes saudáveis ou pacientes com câncer que não apresentavam caquexia (COLLINS et al., 2002).

Como resultado direto dessa disfunção mitocondrial, o músculo esquelético passa a produzir mais EROs o que desencadeia um quadro de estresse oxidativo exacerbado (DER-TOROSSIAN et al., 2013; WHITE et al., 2011) afetando a homeostase redox. As EROs são capazes de oxidar componentes celulares essenciais como as proteínas, os nucleotídeos, os lipídios e os ácidos graxos poli-insaturados. Diante do exposto, Der-Torossian et al., (2013) realizaram análise metabolômica no músculo *gastrocnemius* de camundongos com caquexia induzida pelo carcinoma de colon C26. Foram identificados 234 metabólitos no músculo desses animais, sendo 42 extremamente alterados nos animais com caquexia. Dentre esses metabólitos, destacam-se marcadores de estresse oxidativo, como a glutatona, a carnosina e a anserina (DER-TOROSSIAN et al., 2013). Além da disfunção mitocondrial, ratos com caquexia induzida pela injeção intraperitoneal de células tumorais Yoshida AH 130 apresentam atividade aumentada da xantina oxidase, uma enzima que catalisa a oxidação da hipoxantina em xantina, produzindo ânions superóxido. Quando essa enzima foi inibida, a perda de massa corporal foi atenuada e um pequeno aumento na sobrevivência dos animais foi observado (SPRINGER et al., 2009).

Cabe ressaltar que o estresse oxidativo exacerbado pode contribuir diretamente ou indiretamente (via inflamação) para a ativação de vias proteolíticas, como o SUP. Dessa forma, evidências indicam que a produção exacerbada de espécies reativas de oxigênio advindas da disfunção mitocondrial (ou outras fontes como a xantina oxidase) pode ativar a proteólise no músculo esquelético de pacientes com câncer caracterizando um ciclo vicioso (GOMES-MARCONDES; TISDALE, 2002; RYAN et al., 2011; SANDRI et al., 2004). Nesse sentido, um ensaio clínico foi realizado para avaliar os efeitos da suplementação do antioxidante N-Acetilcisteína (NAC) em pacientes com caquexia induzida pelo câncer (clinicaltrials.gov/NCT00196885), sendo que já é conhecido que a suplementação de NAC

aumenta o desempenho em testes de força de idosos com sarcopenia (HAUER et al., 2003). Ao nosso conhecimento os resultados desse estudo ainda não foram publicados.

Por fim, sabe-se que fibras musculares com características glicolíticas estão mais susceptíveis a estímulos catabólicos (GOLDBERG, 1969), incluindo a caquexia (LI et al., 2007; YU et al., 2008). Acharyya et al. (2005) reportaram em músculos com composição mista de fibras glicolíticas e oxidativas (*gastrocnemius* e quadríceps), que as fibras do tipo II (*i.e.* fibras que apresentam predominância do metabolismo glicolítico) são as que mais atrofiam em camundongos com câncer de colon C26, sendo observada uma diferença de 40% no diâmetro médio dessas fibras quando comparados a animais saudáveis. Em contrapartida, as fibras do tipo I (*i.e.* fibras que apresentam predominância do metabolismo oxidativo) não apresentaram diferenças, sugerindo uma seletividade para fibras com características mais glicolíticas no processo de atrofia. Nesse estudo, os autores ainda demonstraram que o processo de atrofia está associado a uma distrofia da musculatura esquelética em fibras do tipo II (ACHARYYA et al., 2005). Portanto, é pertinente especular que fibras com características mais oxidativas apresentam uma maior defesa aos processos catabólicos envolvidos na atrofia e na distrofia muscular, incluindo uma maior defesa antioxidante. Contudo, esse tópico ainda deve ser investigado mais a fundo, principalmente considerando potenciais terapias capazes de remodelar o músculo esquelético.

1.4. Tratamentos atuais para a caquexia

Tradicionalmente, o controle do desenvolvimento avançado do câncer era considerado a melhor forma de evitar a progressão da doença. Entretanto, diante da ineficácia desses tratamentos (quimioterapia, radioterapia e cirurgias) em atenuar a caquexia apresentada por muitos pacientes, novas estratégias terapêuticas passaram a ser essenciais (FEARON; GLASS; GUTTRIDGE, 2012). Nesse sentido, estudos concentraram esforços em alvos terapêuticos que agissem previamente à produção dos mediadores, bloqueassem vias catabólicas e/ou estimulassem vias anabólicas no músculo esquelético. Cabe ressaltar que muitos estudos clínicos se encontram em fase I ou II (para detalhes ver: clinicaltrials.gov). Entretanto, considerando o cenário atual pouco atrativo, estudos têm sido conduzidos nos últimos anos com a finalidade de descobrir novos alvos para o tratamento da caquexia.

Zhou et al., (2010) demonstraram que o bloqueio do receptor ActRIIB de hormônios da família TGF β , como a miostatina e a activina, reverte a atrofia muscular por meio da normalização da atividade do SUP e aumenta a sobrevida em camundongos injetados com células tumorais de colón C26. O mais interessante nesse estudo é que a sobrevida aumentou

devido à preservação da massa muscular e não por um efeito direto no tumor (ZHOU et al., 2010). Paralelamente, Das et al. (2011) demonstraram que a deleção de lipases dos adipócitos previne a mobilização exacerbada do tecido adiposo em camundongos injetados com células tumorais LLC ou B16. Cabe ressaltar que os autores observaram uma preservação da própria musculatura esquelética em ambos os modelos experimentais, propondo que inibir essas lipases pode ser uma futura terapia para a caquexia do câncer (DAS et al., 2011).

Mais recentemente, o estudo de Kir et al., (2014) identificou a *parathyroid-hormone-related protein* (PTHrP) como um importante mediador da atrofia muscular no modelo de camundongos injetados com células tumorais LLC. Ao inativar essa proteína, os autores observaram uma atenuação da perda da massa e da força da musculatura esquelética. O princípio dessa possível terapia é que a PTHrP medeia o gasto de energia exacerbado comumente observado mesmo no estado basal em pacientes com câncer (KIR et al., 2014, 2016). Por fim, cabe também destacar o recente estudo de He et al., (2014), no qual foi demonstrado que a apoptose de células musculares também está envolvida no processo de perda da massa muscular do câncer. Nesse estudo os autores identificaram o microRNA 21 como um dos mediadores desse processo de apoptose. Infelizmente, os resultados não se estendem ao trofismo das células musculares (HE et al., 2014).

Considerando esses achados em conjunto, fica evidente o interesse da comunidade científica em encontrar alvos terapêuticos para a caquexia do câncer. Embora esses resultados sejam promissores, nenhum tratamento que bloqueie ou ative uma via específica seria capaz de reverter totalmente caquexia, uma vez que essa síndrome é multifatorial. Assim, diferentes autores enfatizam que o tratamento dessa síndrome deve ser multimodal, envolvendo combinações que incluem as estratégias farmacológicas, o apoio nutricional e, principalmente, a prática regular de exercício físico (treinamento físico) (ARGILÉS et al., 2012; FEARON et al., 2011b; FEARON, 2011). Entretanto, os mecanismos envolvidos nos efeitos benéficos do treinamento físico aeróbio ainda foram pouco explorados.

1.5. Treinamento físico aeróbio como um tratamento para a caquexia

O músculo esquelético é um tecido metabolicamente muito ativo e altamente afetado por doenças sistêmicas caracterizadas pela ativação dos sistemas de degradação proteica. Portanto, estratégias capazes de combater a progressão do tumor e atenuar a atrofia muscular são de grande relevância clínica. Dentre as estratégias não farmacológicas, destacamos o papel do treinamento físico aeróbio. O relatório de 2005 do *Institute of Medicine of National Academies* identificou seis pontos no combate ao câncer: 1) prevenção, 2) detecção precoce,

3) diagnóstico, 4) tratamento, 5) sobrevida e 6) cuidados no fim da vida. Diante do exposto, o potencial do treinamento físico aeróbio para combater o câncer parece atuar principalmente na prevenção (item 1) e no tratamento (item 4). De fato, a prática regular de exercícios físicos aeróbios pode reduzir a incidência de diversos tipos de câncer, tais como o de colón, próstata e mama (BAL; WOOLAM; SEFFRIN, 1999; FRIEDENREICH; CUST, 2008; NEILSON et al., 2009; VOGEL, 2000). A prática de 30 minutos de caminhada por dia (prescrição populacional), por exemplo, reduz em 15% a incidência de câncer de colón (BAL; WOOLAM; SEFFRIN, 1999). Em adição, evidências sugerem que um terço das mortes que ocorrem a cada ano nos Estados Unidos estão diretamente relacionadas ao estilo de vida sedentário (DOYLE et al., 2006). Estudos mais recentes demonstraram que a atividade física realizada de lazer está associada com a menor incidência de diversos tipos de câncer (LE; KM; MD, 2016; MOORE et al., 2016). Moore et al. (2016) avaliaram um total de 1,44 milhões de participantes, dos quais 186932 pacientes com câncer foram incluídos. Ao dividir os participantes entre alto e baixo nível de atividade física de lazer, prevalências diferentes foram observadas para 13 tipos de câncer, a saber: esôfago, fígado, pulmão, rins, estômago, endométrio, leucemia mieloide, mieloma, cólon, cabeça e pescoço, reto, bexiga e mama (MOORE et al., 2016).

Além da ação preventiva da prática de exercícios físicos aeróbios, é importante destacar o seu potencial no combate ao câncer já estabelecido (terapêutica). Nesse sentido, estudos realizados na última década demonstram que a prática regular de exercícios físicos aeróbios em intensidade moderada promove principalmente uma melhora na capacidade física e na qualidade de vida (KNOLS et al., 2005; SCHMITZ et al., 2005). Sendo assim, a *American Cancer Society* sugere uma importante ação do treinamento físico aeróbio como terapia coadjuvante no tratamento do câncer, principalmente atenuando a fadiga e a perda de massa muscular da maioria dos pacientes (DOYLE et al., 2006).

Em 1985, Deuster et al. demonstraram que o treinamento físico aeróbio em intensidade moderada reduziu a perda de peso e do conteúdo proteico de ratos nas primeiras semanas após a injeção de células tumorais Walker 256 na região subcutânea (DEUSTER; MORRISON; AHRENS, 1985). No mesmo modelo experimental, Bacurau et al. (2000) demonstraram que o treinamento físico aeróbio em intensidade moderada foi capaz de melhorar o fornecimento de substratos para o sistema imune e aumentar a sobrevida dos animais com o tumor. Os estudos conduzidos por Lira et al. (2008 e 2010) vão ao encontro desses achados, demonstrando que o treinamento físico aeróbio em intensidade moderada

reduz o tamanho do tumor em ratos injetados com o tumor Walker 256 (LIRA et al., 2008, 2009, 2010).

Considerando a severidade e a rápida progressão da doença, estratégias capazes de otimizar os benefícios do treinamento físico aeróbio são de grande relevância. Portanto, é possível especular que diferentes intensidades de treinamento físico poderiam resultar em adaptações distintas. O estudo de Bacurau et al. (2007) demonstrou que o treinamento físico aeróbio contínuo em alta intensidade (85% do $\text{VO}_{2\text{máx}}$), realizado cinco vezes por semana durante 30 minutos/dia, também exerceu um papel positivo no sistema imune, foi efetivo em aumentar expressivamente a sobrevida dos animais e diminuiu a porcentagem do tumor em relação à massa corporal após 15 dias de injeção. O mais interessante nesse trabalho é que a alta intensidade no protocolo de treinamento físico aeróbio foi segura e eficaz em melhorar a função imunológica, avaliada por diversos parâmetros como o metabolismo da glicose e da glutamina em linfócitos e macrófagos (BACURAU et al., 2007a). Infelizmente, nenhuma mensuração específica quanto ao impacto do treinamento físico aeróbio na musculatura esquelética foi realizada nesse estudo.

Ainda nesse contexto, é conhecido que pacientes com caquexia induzida pelo câncer apresentam altos índices de fadiga, sendo uma das principais limitações para realizar uma sessão de treinamento físico. Portanto, embora promissores, exercícios físicos em intensidades mais elevadas poderiam ser vistos como uma barreira na prática clínica. Entretanto, um modelo de treinamento intervalado (períodos de exercício físico realizados em alta intensidade intercalados por períodos de exercício em intensidade moderada ao longo da sessão de treino) parece ser bem tolerado em doenças crônico-degenerativas (GIBALA et al., 2012; HWANG; WU; CHOU, 2011; WISLOFF et al., 2007) e, portanto, surge como uma alternativa para aumentar a intensidade dos exercícios físicos em curtos períodos de tempo, sendo pertinente especular que isso refletiria em um aumento da adesão dos pacientes e com impacto mais pronunciado na aptidão física dos mesmos.

Estudos recentes demonstram resultados superiores do treinamento intervalado em alta intensidade quando comparado com o treinamento contínuo em intensidade moderada em sujeitos saudáveis (GIBALA et al., 2006) ou com acometimentos cardiovasculares (WISLOFF et al., 2007). No estudo de Gibala et al. (2006) apenas seis sessões de treinamento intervalado em alta intensidade foram capazes de aumentar o tempo até a exaustão de indivíduos jovens e saudáveis, enquanto não foi observado o mesmo efeito após seis sessões de treinamento contínuo em intensidade moderada (65% do $\text{VO}_{2\text{máx}}$). Nosso grupo avaliou um protocolo de treinamento intervalado em alta intensidade no músculo esquelético de ratos

com infarto do miocárdio e disfunção ventricular grave. Os resultados demonstraram maior distância total percorrida associado a um maior $\text{VO}_2\text{máx}$ em teste de esforço nos ratos infartados submetidos ao treinamento intervalado em alta intensidade quando comparados com ratos infartados submetidos ao treinamento contínuo em intensidade moderada (MOREIRA et al., 2013).

Diante do exposto, estudar os efeitos de diferentes intensidades e protocolos de treinamento físico aeróbio no tratamento da caquexia induzida pelo câncer faz-se necessário. Contudo, apesar de todos os possíveis efeitos benéficos do treinamento físico sobre a caquexia, como, por exemplo, o aumento da capacidade antioxidante e a ação anti-inflamatória (DEMARZO et al., 2008; GOULD et al., 2013), algumas considerações importantes devem ser feitas. Wang et al. (2012) demonstraram efeitos adversos do aumento do conteúdo mitocondrial no câncer em animais que superexpressam PGC-1 α , um co-fator de transcrição envolvido na biogênese mitocondrial. Portanto, o aumento da PGC-1 α não atenuou a atrofia do músculo esquelético e acelerou o crescimento do tumor (WANG et al., 2012). Considerando que o treinamento físico aeróbio também aumenta a expressão de PGC-1 α (CHINSOMBOON et al., 2009), investigar se as adaptações induzidas pelo treinamento físico apresentam efeitos adversos faz-se necessário. Além disso, a provável dificuldade em realizar cada sessão de exercícios durante o programa de treinamento físico, devido aos altos índices de fadiga induzidos pela caquexia, também deve ser considerada.

Em suma, embora o racional e a hipótese de que o treinamento físico aeróbio possa atuar como uma importante estratégia não farmacológica na prevenção da atrofia muscular e disfunção metabólica, os estudos sobre a eficácia e a segurança do treinamento físico aeróbio sobre a caquexia do câncer ainda são poucos e inconclusivos (ARGILÉS et al., 2012).

1.6. Modelos animais de caquexia induzida pelo câncer

Diante da importância da função muscular para a qualidade e a expectativa de vida em pacientes com caquexia, um maior aprofundamento dos mecanismos envolvidos no processo de atrofia muscular e disfunção do metabolismo energético é de grande relevância científica. Como pode ser observado durante os estudos citados nessa revisão de literatura, modelos animais com injeção de células tumorais têm sido amplamente utilizados na ciência. De fato, a discussão sobre o uso de animais na ciência médica ganhou muita visibilidade devido ao grande número de trabalhos publicados anualmente. Embora os dados obtidos em estudos com modelos animais sejam apenas pré-clínicos, eles vêm colaborando sobremaneira para o entendimento dos mecanismos envolvidos em diferentes doenças sistêmicas, como no caso do

câncer (ANISIMOV; UKRAINTSEVA; YASHIN, 2005; BART VAN DER WORP et al., 2010; DRANOFF, 2012; HUNTER, 2012). Além disso, estudos com experimentação animal permitem avaliar os efeitos deletérios específicos do tumor, enquanto que ensaios clínicos nos quais há evidente necessidade de tratamentos, tais como quimioterapia e radioterapia, não permitem distinguir a qual dos estímulos está associada à caquexia (tumor ou tratamento), uma vez que tratamentos como os quimioterápicos são muitas vezes agressivos não apenas às células tumorais, mas também às células normais do organismo.

Embora alguns modelos de câncer sejam induzidos quimicamente ou por modificação genética, a maioria dos estudos sobre a caquexia induzida pelo câncer é realizada em modelos nos quais células tumorais são injetadas nos animais. Consequentemente, essas células irão se proliferar, resultando no aparecimento de um tumor (DRANOFF, 2012). Uma grande variedade de linhagens celulares tem sido utilizada para a injeção em camundongos, a saber: o melanoma B16, o carcinoma de colon C26, o carcinoma de mama 4T1, o linfoma EL4 T e o LLC. Em adição, as linhagens mais utilizadas para ratos são: o tumor de Yoshida AH 130 e o carcinoma de Walker 256. Dentre essas linhagens, destacamos o carcinoma de Walker 256 que será inicialmente utilizado nesse estudo.

O carcinoma de Walker 256 é uma neoplasia espontânea de ratos, identificada na mama de uma rata albina prenhe, por George Walker, em 1928. O próprio investigador iniciou a manutenção do tumor, implantando-o em mamas de ratas. Desde então, os tumores têm sido mantidos por transplantes sucessivos ou em culturas de células *in vitro*. O tumor de Walker 256 é capaz de se desenvolver na forma sólida ou ascítica. Dessa forma, ele pode se desenvolver em regiões distintas, como no cérebro, no músculo, na cavidade peritoneal, no tecido subcutâneo e na medula óssea (DAS NEVES et al., 2016; MAO-YING et al., 2006; MORIOKA et al., 1992; SEELAENDER et al., 1996; SOARES et al., 1994).

Nesse estudo, optamos por padronizar em nosso laboratório a injeção de células tumorais Walker 256 na região subcutânea e na medula óssea de ratos. Primeiramente, escolhemos a região subcutânea (injeção na região subcutânea do flanco superior direito) pois a maioria dos estudos que avaliaram os efeitos do treinamento físico aeróbio, utilizaram esse modelo (BACURAU et al., 2007b; DEUSTER; MORRISON; AHRENS, 1985; LIRA et al., 2010; SEELAENDER et al., 1996). Devido a dificuldades metodológicas na padronização desse modelo em nosso laboratório, padronizamos também a injeção na região da medula óssea (DAS NEVES et al., 2016). Esse modelo foi inicialmente proposto por Mao-Ying et al., (2006) (MAO-YING et al., 2006) e adaptado pelo grupo da Prof^a. Dr^a. Yara Cury do Laboratório Especial de Dor e Sinalização do Instituto Butantan, sendo importante destacar

que o modelo desenvolve caquexia. Por fim, optamos por trabalhar com ratos no início desse projeto devido 1) a fácil manipulação e criação em biotério, 2) a padronização de diferentes tipos de treinamento físico aeróbio com boa resposta dos animais e 3) por apresentar mais tecido para as análises propostas quando comparado à camundongos. Para as etapas experimentais subsequentes, adicionamos nesse estudo dois modelos de câncer em camundongos já bem descritos na literatura, sendo eles: a injeção na região subcutânea de células tumorais do melanoma B16F10 (DAS et al., 2011) e do LLC (KIR et al., 2014).

2. OBJETIVOS

Esse estudo teve como objetivo central avaliar os efeitos do treinamento físico aeróbio contínuo em intensidade moderada (MIT, do inglês *moderate intensity training*) e do treinamento físico intervalado em alta intensidade (HIIT, do inglês *high-intensity interval training*) sobre a disfunção do metabolismo energético e a atrofia muscular durante a progressão da caquexia induzida pelo câncer em modelo experimental. Além disso, buscamos explorar mecanismos envolvidos nos possíveis efeitos terapêuticos do treinamento físico aeróbio.

Mais especificamente, buscamos responder as seguintes perguntas:

I. O treinamento físico aeróbio é capaz de atenuar a disfunção do metabolismo energético e a atrofia da musculatura esquelética durante a rápida progressão da caquexia induzida pelo câncer em modelo animal?

Para isso, buscamos:

- a) caracterizar um modelo de caquexia induzida pelo câncer em ratos
- b) avaliar os efeitos do MIT e HIIT sobre o metabolismo e o trofismo do músculo esquelético durante a progressão da caquexia nesse modelo.

II. Quais são os mecanismos envolvidos nos possíveis efeitos terapêuticos do treinamento físico aeróbio sobre a musculatura esquelética na caquexia induzida pelo câncer?

Para isso, buscamos:

- a) identificar proteínas moduladas pela caquexia e pelo treinamento físico aeróbio em diferentes modelos animais de câncer
- b) avaliar a contribuição de uma dessas proteínas para a proteção de miotubos *in vitro*.

4. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Essa tese de doutorado demonstrou que diferentes protocolos de treinamento físico aeróbico (MIT e HIIT) foram capazes de atenuar a intolerância ao esforço físico e aumentar a sobrevida em um modelo de caquexia induzido pela injeção de células tumorais Walker 256 na medula óssea de ratos. O protocolo HIIT ainda reestabeleceu a função do músculo esquelético e normalizou marcadores de estresse oxidativo. Além disso, identificamos a proteína COPS2/TRIP15 como uma das mais alteradas em uma análise proteômica no músculo esquelético desse modelo. Cabe ressaltar que o conteúdo de COPS2/TRIP15 foi normalizado após os animais serem submetidos ao protocolo HIIT. Resultados similares foram observados no modelo de câncer B16F10 em camundongos submetidos ou não ao HIIT. Portanto, esses resultados pré-clínicos abrem perspectivas de avaliar os efeitos do HIIT em pacientes com caquexia do câncer e de explorar a COPS2/TRIP15 como um potencial biomarcador de caquexia em pacientes com câncer. Nesse sentido, em conjunto com nossos colaboradores do ICESP e do INCOR, temos como proposta para os próximos anos avaliar o conteúdo proteico de COPS2/TRIP15 no músculo esquelético em pacientes com câncer de pulmão metastático. Optamos por esse tipo de câncer devido a alta prevalência de caquexia e o tratamento de primeira linha padronizado no ICESP. Esse projeto foi recentemente aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa da FMUSP (protocolo 1.731.352) e será inscrito no banco de ensaios norte-americano *ClinicalTrial* (www.clinicaltrial.gov), conforme solicitado pelos jornais científicos de grande impacto na área de saúde. Além disso, novos experimentos ainda são necessários para concluir se a COPS2/TRIP15 apresenta ou não um potencial terapêutico. Dentre esses experimentos, avaliar a participação do COP9 *signalosome complex* bem como as vias FXR/RXR e a LXR/RXR passa a ser de grande interesse científico.

Nessa tese também padronizamos algumas estratégias experimentais que podem ser utilizadas para dar continuidade nessa linha de pesquisa em nosso laboratório. Dentre elas destaca-se injeção das células Walker 256 na medula óssea de ratos como um modelo altamente reprodutivo de caquexia do câncer. Embora apresente suas limitações, esse modelo exhibe crescimento tumoral e mortalidade homogêneos, o que diminui a variabilidade comumente observada em outros modelos de câncer, como o próprio B16F10 e o LLC também utilizados nesse estudo. Outra estratégia experimental aplicada que merece destaque é a seleção de clones de células tumorais que induzem ou não caquexia. Essa estratégia pode ser de grande valia nos próximos experimentos, proporcionando melhores grupos controle para os experimentos (*e.g.* câncer sem caquexia *vs.* com caquexia) ou auxiliando na descoberta de novos alvos terapêuticos.

REFERÊNCIAS

- ACHARYYA, S. et al. Dystrophin glycoprotein complex dysfunction: A regulatory link between muscular dystrophy and cancer cachexia. **Cancer Cell**, v. 8, n. 5, p. 421–432, 2005.
- AGUSTSSON, T. et al. Mechanisms for skeletal muscle insulin resistance in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. **Nutrition**, v. 27, n. 7–8, p. 796–801, 2011.
- AKIYAMA, H. et al. Implication of Trip15 / CSN2 in early stage of neuronal differentiation of P19 embryonal carcinoma cells. **Developmental Brain Research**, v. 140, p. 45–56, 2003.
- ALVES, C. R. R. et al. **Aerobic exercise training as therapy for cardiac and cancer cachexia** Life Sciences Elsevier Inc., , 2015.
- ANISIMOV, V. N.; UKRAINTSEVA, S. V.; YASHIN, A. I. Cancer in rodents: does it tell us about cancer in humans? **Nature reviews. Cancer**, v. 5, n. 10, p. 807–819, 2005.
- ARGILÉS, J. M. et al. Are there any benefits of exercise training in cancer cachexia? **Journal of cachexia, sarcopenia and muscle**, v. 3, n. 2, p. 73–6, 2012.
- ARGILÉS, J. M. et al. Cancer cachexia: understanding the molecular basis. **Nature reviews. Cancer**, v. 14, n. 11, p. 754–62, 2014.
- ARGILÉS, J. M.; ALVAREZ, B.; LÓPEZ-SORIANO, F. J. **The metabolic basis of cancer cachexia** Medicinal Research Reviews, 1997.
- ARGILÉS, J. M.; BUSQUETS, S.; LÓPEZ-SORIANO, F. J. **Anti-inflammatory therapies in cancer cachexia**. European Journal of Pharmacology. **Anais...**2011
- ARIA TZIKA, A. et al. Skeletal muscle mitochondrial uncoupling in a murine cancer cachexia model. **International Journal of Oncology**, v. 43, n. 3, p. 886–894, 2013.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CUIDADOS PALIATIVOS. Consenso Brasileiro de Caquexia / anorexia. **Revista Brasileira de Cuidados Paliativos**, v. 3, n. 3, p. 23, 2011.
- BACHMANN, J. et al. Cachexia worsens prognosis in patients with resectable pancreatic cancer. **Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract**, v. 12, n. 7, p. 1193–201, 2008.
- BACURAU, A. V. N. et al. Effect of a high-intensity exercise training on the metabolism and function of macrophages and lymphocytes of walker 256 tumor bearing rats. **Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)**, v. 232, n. 10, p. 1289–99, 2007a.
- BACURAU, A. V. N. et al. Effect of a High-Intensity Exercise Training on the Metabolism and Function of Macrophages and Lymphocytes of Walker 256 Tumor-Bearing Rats. **Experimental Biology and Medicine**, v. 232, n. 10, p. 1289–1299, 2007b.
- BAL, D. G.; WOOLAM, G. L.; SEFFRIN, J. R. Dietary change and cancer prevention: what don't we know and when didn't we know it? **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 49, n. 6, p. 327–30., 1999.
- BARACOS, V. E. et al. Body composition in patients with non-small cell lung cancer: a contemporary view of cancer cachexia with the use of computed tomography image analysis. **Am J Clin.Nutr.**, v. 91, n. 1938–3207 (Electronic), p. 1133S–1137S, 2010.
- BART VAN DER WERP, H. et al. Can animal models of disease reliably inform human studies? **PLoS Medicine**, v. 7, n. 3, p. 1–8, 2010.
- BASTARD, J.-P. et al. Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. **European Cytokine Network**, v. 17, n. 1, p. 4–12, 2006.
- BECHARA, L. R. G. et al. NADPH oxidase hyperactivity induces plantaris atrophy in heart failure rats. **International journal of cardiology**, v. 175, n. 3, p. 499–507, 2014.
- BODINE, S. C. et al. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. **Science (New York, N.Y.)**, v. 294, n. 5547, p. 1704–8, 2001.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.

BRUTON, J. D. et al. Reactive oxygen species and fatigue-induced prolonged low-frequency force depression in skeletal muscle fibres of rats, mice and SOD2 overexpressing mice. **The Journal of Physiology**, v. 586, n. 1, p. 175–184, 2008.

CAMPOS, J. C. et al. Exercise Training Restores Cardiac Protein Quality Control in Heart Failure. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, 2012.

CAMPOS, J. C. et al. Increased clearance of reactive aldehydes and damaged proteins in hypertension-induced compensated cardiac hypertrophy: Impact of exercise training. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2015, 2015.

CHIAPPETTA, G. et al. Chapter 10 – Proteome Screens for Cys Residues Oxidation: The Redoxome. In: **Methods in Enzymology**. [s.l.: s.n.]. v. 473p. 199–216.

CHINSOMBOON, J. et al. The transcriptional coactivator PGC-1 α mediates exercise-induced angiogenesis in skeletal muscle. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 50, p. 21401–6, 2009.

CLARKE, B. A. et al. The E3 Ligase MuRF1 Degrades Myosin Heavy Chain Protein in Dexamethasone-Treated Skeletal Muscle. **Cell Metabolism**, v. 6, n. 5, p. 376–385, 2007.

COLLINS, P. et al. Muscle UCP-3 mRNA levels are elevated in weight loss associated with gastrointestinal adenocarcinoma in humans. **British journal of cancer**, v. 86, n. 3, p. 372–5, 2002.

CONSTANTINOU, C. et al. Nuclear magnetic resonance in conjunction with functional genomics suggests mitochondrial dysfunction in a murine model of cancer cachexia. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 27, n. 1, p. 15–24, 2011.

COPPACK, S. W. Pro-inflammatory cytokines and adipose tissue. **The Proceedings of the Nutrition Society**, v. 60, n. 3, p. 349–56, 2001.

CUNHA, T. F. et al. Exercise training prevents oxidative stress and ubiquitin-proteasome system overactivity and reverse skeletal muscle atrophy in heart failure. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, 2012.

DAS, S. K. et al. Adipose triglyceride lipase contributes to cancer-associated cachexia. **Science (New York, N.Y.)**, v. 333, n. 6039, p. 233–238, 2011.

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 Sciences**, v. 163, p. 11–22, 2016.

DE ZWART, L. L. et al. **Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans** **Free Radical Biology and Medicine**, 1999.

DEMARZO, M. M. et al. Exercise reduces inflammation and cell proliferation in rat colon carcinogenesis. **Med Sci Sports Exerc**, v. 40, n. 19, p. 618–621, 2008.

DER-TOROSSIAN, H. et al. Metabolic derangements in the gastrocnemius and the effect of Compound A therapy in a murine model of cancer cachexia. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 4, n. 2, p. 145–155, 2013.

DEUSTER, P. A.; MORRISON, S. D.; AHRENS, R. A. **Endurance exercise modifies cachexia of tumor growth in rats.** **Medicine & Science in Sports & Exercise**, 1985.

DOYLE, C. et al. Nutrition and Physical Activity During and After Cancer Treatment: An American Cancer Society Guide for Informed Choices. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 56, n. 6, p. 323–353, 2006.

DRANOFF, G. Experimental mouse tumour models: what can be learnt about human cancer immunology? **Nat Rev Immunol**, v. 12, n. 1, p. 61–66, 2012.

FEARON, K. et al. Definition and classification of cancer cachexia: An international

consensus. **The Lancet Oncology**, v. 12, n. 5, p. 489–495, 2011a.

FEARON, K. et al. Definition and classification of cancer cachexia: an international consensus. **The lancet oncology**, v. 12, n. 5, p. 489–495, 2011b.

FEARON, K. C. H. Cancer Cachexia and Fat-Muscle Physiology. **New England Journal of Medicine**, v. 365, n. 6, p. 565–567, 2011.

FEARON, K. C. H.; GLASS, D. J.; GUTTRIDGE, D. C. Cancer cachexia: Mediators, signaling, and metabolic pathways. **Cell Metabolism**, v. 16, n. 2, p. 153–166, 2012.

FEARON, K. C.; VOSS, A. C.; HUSTEAD, D. S. Definition of cancer cachexia: Effect of weight loss, reduced food intake, and systemic inflammation on functional status and prognosis. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 83, n. 6, p. 1345–1350, 2006.

FERMOSELLE, C. et al. Mitochondrial dysfunction and therapeutic approaches in respiratory and limb muscles of cancer cachectic mice. **Experimental physiology**, v. 98, n. 9, p. 1349–65, 2013.

FRIEDENREICH, C. M.; CUST, A. E. Physical activity and breast cancer risk: impact of timing, type and dose of activity and population subgroup effects. **British journal of sports medicine**, v. 42, n. 8, p. 636–47, 2008.

GIBALA, M. J. et al. Short-term sprint interval versus traditional endurance training: similar initial adaptations in human skeletal muscle and exercise performance. **J. Physiol.**, v. 575, n. Pt 3, p. 901–911, 2006.

GIBALA, M. J. et al. Physiological adaptations to low-volume, high-intensity interval training in health and disease. **The Journal of physiology**, v. 590, n. 5, p. 1077–1084, 2012.

GIBERTINI, S. et al. Fibrosis and inflammation are greater in muscles of beta-sarcoglycan-null mouse than mdx mouse. **Cell and Tissue Research**, v. 356, n. 2, p. 427–443, 2014.

GLASS, D. J. Signaling pathways perturbing muscle mass. **Current opinion in clinical nutrition and metabolic care**, v. 13, n. 3, p. 225–229, 2010.

GLICKMAN, M. H.; CIECHANOVER, A. The Ubiquitin-Proteasome Proteolytic Pathway: Destruction for the Sake of Construction. **Physiological Reviews**, v. 82, n. 2, p. 373–428, 2002.

GOLDBERG, A. L. Protein turnover in skeletal muscle. II. Effects of denervation and cortisone on protein catabolism in skeletal muscle. **Journal of Biological Chemistry**, v. 244, n. 12, p. 3223–3229, 1969.

GOMES-MARCONDES, M. C. C.; TISDALE, M. J. Induction of protein catabolism and the ubiquitin-proteasome pathway by mild oxidative stress. **Cancer Letters**, v. 180, n. 1, p. 69–74, 2002.

GOMES, M. D. et al. Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 25, p. 14440–5, 2001.

GOULD, D. W. et al. Cancer cachexia prevention via physical exercise: Molecular mechanisms. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 4, n. 2, p. 111–124, 2013.

GRIVENNIKOV, S. I.; GRETEN, F. R.; KARIN, M. Immunity, inflammation, and cancer. **Cell (Cambridge, MA, United States)**, v. 140, n. 6, p. 883–899, 2010.

GUARNIER, F. A. et al. Time course of skeletal muscle loss and oxidative stress in rats with walker 256 solid tumor. **Muscle and Nerve**, v. 42, n. 6, p. 950–958, 2010.

HARRINGTON, G. M.; BLIZARD, D. A. Open-field behavior in the Maudsley reactive and nonreactive strains: Procedural variations. **Behavior Genetics**, v. 13, n. 1, p. 91–94, 1983.

HAUER, K. et al. Improvement in muscular performance and decrease in tumor necrosis factor level in old age after antioxidant treatment. **Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)**, v. 81, n. 2, p. 118–25, 2003.

HE, W. A et al. Microvesicles containing miRNAs promote muscle cell death in cancer cachexia via TLR7. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 12, p. 4525–9, 2014.

HOLROYDE, C. P. et al. Altered Glucose Metabolism in Metastatic Carcinoma. **Cancer Research**, v. 35, n. 12, p. 3710–3714, 1975.

HUANG, D. W.; LEMPICKI, R. A; SHERMAN, B. T. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. **Nature Protocols**, v. 4, n. 1, p. 44–57, 2009.

HUNTER, K. W. Mouse models of cancer: does the strain matter? **Nat Rev Cancer**, v. 12, n. 2, p. 144–149, 2012.

HWANG, C.-L.; WU, Y.-T.; CHOU, C.-H. Effect of aerobic interval training on exercise capacity and metabolic risk factors in people with cardiometabolic disorders: a meta-analysis. **Journal of cardiopulmonary rehabilitation and prevention**, v. 31, n. 6, p. 378–85, 2011.

HYLTANDER, A. et al. Elevated energy expenditure in cancer patients with solid tumours. **European Journal of Cancer**, v. 27, p. 9–15, 1991.

JATOI, A. et al. **A placebo-controlled, double-blind trial of infliximab for cancer-associated weight loss in elderly and/or poor performance non-small cell lung cancer patients (N01C9).Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)**, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19665818>>

JEMAL A, BRAY F, CENTER MM, FERLAY J, WARD E, F. D. Global cancer statistics. **Cancer J Clin**, v. 61, p. 69–90, 2011.

JENTSCH, S. **Ubiquitin-dependent protein degradation: a cellular perspective**Trends in Cell Biology, 1992.

JOHNS, N.; STEPHENS, N. A.; FEARON, K. C. H. Muscle wasting in cancer. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 45, n. 10, p. 2215–2229, 2013.

JUGE-AUBRY, C. E.; HENRICHOT, E.; MEIER, C. A. **Adipose tissue: A regulator of inflammation**Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism, 2005.

KIR, S. et al. Tumour-derived PTH-related protein triggers adipose tissue browning and cancer cachexia. **Nature**, v. 1, p. 1–19, 2014.

KIR, S. et al. PTH/PTHrP receptor mediates cachexia in models of kidney failure and cancer. **Cell Metabolism**, v. 23, n. 2, p. 315–323, 2016.

KNOLS, R. et al. Physical exercise in cancer patients during and after medical treatment: a systematic review of randomized and controlled clinical trials. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 23, n. 16, p. 3830–42, 2005.

KOBA, W.; JELICKS, L. A; FINE, E. J. MicroPET/SPECT/CT imaging of small animal models of disease. **The American journal of pathology**, v. 182, n. 2, p. 319–24, 2013.

KRIEGENBURG, F. et al. Redox control of the ubiquitin-proteasome system: from molecular mechanisms to functional significance. **Antioxidants & redox signaling**, v. 15, n. 8, p. 2265–2299, 2011.

KURODA, K. et al. Interleukin 6 Is Associated with Cachexia in Patients with Prostate Cancer. **Urology**, v. 69, n. 1, p. 113–117, 2007.

LADNER, K. J.; CALIGIURI, M. A.; GUTTRIDGE, D. C. Tumor necrosis factor-regulated biphasic activation of NF- κ B is required for cytokine-induced loss of skeletal muscle gene products. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 4, p. 2294–2303, 2003.

LAGIRAND-CANTALOUBE, J. et al. The initiation factor eIF3-f is a major target for atrogin1/MAFbx function in skeletal muscle atrophy. **The EMBO journal**, v. 27, n. 8, p.

1266–76, 2008.

LAVIANO, A. et al. Neural control of the anorexia-cachexia syndrome. p. 1000–1009, 2008.

LE, M.; KM, M.; MD, G. The promise of leisure-time physical activity to reduce risk of cancer development. **JAMA Internal Medicine**, 2016.

LECKER, S. H. et al. Muscle protein breakdown and the critical role of the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. **Journal of Nutrition**, v. 129, n. 1, p. 227S–237S, 1999.

LECKER, S. H. et al. Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression. **The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 18, n. 1, p. 39–51, 2004.

LESSARD, S. J. et al. The AMPK-related kinase SNARK regulates muscle mass and myocyte survival. **Journal of Clinical Investigation**, p. 1–11, 2015.

LI, P. et al. Oxidative phenotype protects myofibers from pathological insults induced by chronic heart failure in mice. **The American journal of pathology**, v. 170, n. 2, p. 599–608, 2007.

LIRA, F. S. et al. Effect of endurance training upon lipid metabolism in the liver of cachectic tumour-bearing rats. **Cell Biochemistry and Function**, v. 26, n. 6, p. 701–708, 2008.

LIRA, F. S. et al. Chronic exercise decreases cytokine production in healthy rat skeletal muscle. **Cell Biochemistry and Function**, v. 27, n. 7, p. 458–461, 2009.

LIRA, F. S. et al. Exercise training reduces PGE2 levels and induces recovery from steatosis in tumor-bearing rats. **Hormone and Metabolic Research**, v. 42, n. 13, p. 944–949, 2010.

LU, H. et al. Revealing the dynamics of the 20 S proteasome phosphoproteome: a combined CID and electron transfer dissociation approach. **Molecular & cellular proteomics : MCP**, v. 7, n. 11, p. 2073–89, 2008.

LUNDHOLM, K. et al. Insulin treatment in cancer cachexia: effects on survival, metabolism, and physical functioning. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 13, n. 9, p. 2699–2706, 2007.

LYKKE-ANDERSEN, K. et al. Disruption of the COP9 Signalosome Csn2 Subunit in Mice Causes Deficient Cell Proliferation, Accumulation of p53 and Cyclin E, and Early Embryonic Death. **MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY**, v. 23, n. 19, p. 6790–6797, 2003.

MAO-YING, Q.-L. et al. A rat model of bone cancer pain induced by intra-tibia inoculation of Walker 256 mammary gland carcinoma cells. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 345, n. 4, p. 1292–8, 2006.

MARIN-CORRAL, J. et al. Redox Balance and Carbonylated Proteins in Limb and Heart Muscles of Cachectic Rats. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 12, n. 3, p. 365–380, 2010.

MCCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). **Journal of Biological Chemistry**, v. 244, n. 22, p. 6049–6055, 1969.

MCCORKLE, R. et al. Self-management: Enabling and empowering patients living with cancer as a chronic illness. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 61, n. 1, p. 50–62, 2011.

MCKENNA, M. J. et al. N-acetylcysteine attenuates the decline in muscle Na⁺,K⁺-pump activity and delays fatigue during prolonged exercise in humans. **The Journal of Physiology**, v. 576, n. 1, p. 279–288, 2006.

MEDBØ, J. I.; TABATA, I. Anaerobic energy release in working muscle during 30 s

to 3 min of exhausting bicycling. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 75, n. 4, p. 1654–1660, 1993.

MITCHELL, P.; MOYLE, J. Chemiosmotic hypothesis of oxidative phosphorylation. **Nature**, v. 213, n. 5072, p. 137–139, 1967.

MITTAL, A. et al. The TWEAK-Fn14 system is a critical regulator of denervation-induced skeletal muscle atrophy in mice. **Journal of Cell Biology**, v. 188, n. 6, p. 833–849, 2010.

MOORE, K. W. et al. INTERLEUKIN-10 AND THE INTERLEUKIN-10 RECEPTOR. **Annual Review of Immunology**, v. 19, p. 683–765, 2001.

MOORE, S. C. et al. Association of Leisure-Time Physical Activity With Risk of 26 Types of Cancer in 1.44 Million Adults. **JAMA internal medicine**, v. 176, n. 6, p. 816–25, 2016.

MOREIRA, J. B. N. et al. High- versus moderate-intensity aerobic exercise training effects on skeletal muscle of infarcted rats. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 114, n. 8, p. 1029–41, 2013.

MORIOKA, T. et al. Inflammatory cell infiltrates vary in experimental primary and metastatic brain tumors. **Neurosurgery**, v. 30, n. 6, p. 891–896, 1992.

MOSES, A. G. et al. Pro-inflammatory cytokine release by peripheral blood mononuclear cells from patients with advanced pancreatic cancer: relationship to acute phase response and survival. **Oncol Rep**, v. 21, n. 4, p. 1091–1095, 2009.

MOSES, A. W. G. et al. Reduced total energy expenditure and physical activity in cachectic patients with pancreatic cancer can be modulated by an energy and protein dense oral supplement enriched with n-3 fatty acids. **British journal of cancer**, v. 90, n. 5, p. 996–1002, 2004.

NEILSON, H. K. et al. **Physical activity and postmenopausal breast cancer: Proposed biologic mechanisms and areas for future research** **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**, 2009.

NOUROOZ-ZADEH, J.; TAJADDINI-SARMADI, J.; WOLFF, S. P. **Measurement of plasma hydroperoxide concentrations by the ferrous oxidation-xylenol orange assay in conjunction with triphenylphosphine**. **Analytical biochemistry**, 1994.

PAPAIOANNOU, M.; MELLE, C.; BANIAHMAD, A. The coregulator Alien. **Nuclear Receptor Signaling**, v. 5, 2007.

PORPORATO, P. E. Understanding cachexia as a cancer metabolism syndrome. **Oncogenesis**, v. 5, n. 2, p. e200, 2016.

RANDALL, L. O.; SELITTO, J. J. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. **Archives internationales de pharmacodynamie et de therapie**, v. 111, n. 4, p. 409–19, 1957.

REID, M. B.; LI, Y. P. Tumor necrosis factor-alpha and muscle wasting: a cellular perspective. **Respiratory research**, v. 2, n. 5, p. 269–72, 2001.

RYAN, M. J. et al. Inhibition of xanthine oxidase reduces oxidative stress and improves skeletal muscle function in response to electrically stimulated isometric contractions in aged mice. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 51, n. 1, p. 38–52, 2011.

SANDRI, M. et al. Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. **Cell**, v. 117, n. 3, p. 399–412, 2004.

SANDRI, M. Protein breakdown in muscle wasting: Role of autophagy-lysosome and ubiquitin-proteasome. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 45, n. 10, p. 2121–2129, 2013.

SANDRI, M. et al. Misregulation of autophagy and protein degradation systems in myopathies and muscular dystrophies. **Journal of Cell Science**, v. 126, n. 23, p. 5325–5333, 2013.

SCHIAFFINO, S. et al. **Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy***FEBS Journal*, 2013.

SCHMITZ, K. H. et al. Controlled physical activity trials in cancer survivors: a systematic review and meta-analysis. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 14, n. 7, p. 1588–95, 2005.

SEELAENDER, M. C. L. et al. Studies on the lipid metabolism of Walker 256 tumour-bearing rats during the development of cancer cachexia. **BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY INTERNATIONAL**, v. 39, n. 5, p. 1037–1047, 1996.

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

SIEGEL, R. et al. Cancer statistics, 2011. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 61, n. 4, p. 212–236, 2011.

SIEGEL, R. et al. Cancer statistics, 2014. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 64, n. 1, p. 9–29, 2014.

SKIPWORTH, R. J. E. et al. Interaction of gonadal status with systemic inflammation and opioid use in determining nutritional status and prognosis in advanced pancreatic cancer. **Supportive Care in Cancer**, v. 19, n. 3, p. 391–401, 2011.

SMITH, K. L.; TISDALE, M. J. Increased protein degradation and decreased protein synthesis in skeletal muscle during cancer cachexia. **British journal of cancer**, v. 67, n. 4, p. 680–5, 1993.

SOARES, F. A. et al. Quantification and morphologic demonstration of reactive oxygen species produced by Walker 256 tumor cells in vitro and during metastasis in vivo. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, v. 71, n. 4, p. 480–9, 1994.

SPRINGER, J. et al. The xanthine oxidase inhibitors oxypurinol and allopurinol reduce wasting and improve cardiac function in experimental cancer cachexia. **Journal of cardiac failure**, v. 1), p. S22, 2009.

STANFORD, K. I. et al. Brown adipose tissue regulates glucose homeostasis and insulin sensitivity. **J Clin Invest**, v. 123, n. 1, p. 215–223, 2013.

SZKLARCZYK, D. et al. STRING v10: Protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. D1, p. D447–D452, 2015.

TENBAUM, S. P. et al. Alien/CSN2 gene expression is regulated by thyroid hormone in rat brain. [s.d.].

TISDALE, M. J. Mechanisms of Cancer Cachexia. p. 381–410, 2009.

TISDALE, M. J. **Reversing cachexia***Cell*, 2010.

TODOROV, P. T.; FIELD, W. N.; TISDALE, M. J. Role of a proteolysis-inducing factor (PIF) in cachexia induced by a human melanoma (G361). **British journal of cancer**, v. 80, n. 11, p. 1734–7, 1999.

VAN EYS, J. Nutrition and cancer: physiological interrelationships. **Annual review of nutrition**, v. 5, p. 435–61, 1985.

VOGEL, V. G. Breast cancer prevention: a review of current evidence. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 50, n. 3, p. 156–70, 2000.

WANG, X. et al. Increase in muscle mitochondrial biogenesis does not prevent muscle loss but increased tumor size in a mouse model of acute cancer-induced cachexia. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, 2012.

WHITE, J. P. et al. **The Regulation of Skeletal Muscle Protein Turnover during the Progression of Cancer Cachexia in the ApcMin/+ Mouse***PLoS ONE*, 2011.

WILLIAMS, A. B. et al. Sepsis stimulates release of myofilaments in skeletal muscle by a calcium-dependent mechanism. **The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 13, p. 1435–1443, 1999.

WISLOFF, U. et al. Superior cardiovascular effect of aerobic interval training versus moderate continuous training in heart failure patients: a randomized study. **Circulation**, v. 115, n. 24, p. 3086–3094, 2007.

WISLØFF, U. et al. Cardiovascular risk factors emerge after artificial selection for low aerobic capacity. **Science (New York, N.Y.)**, v. 307, n. 5708, p. 418–20, 2005.

WU, J. et al. The unfolded protein response mediates adaptation to exercise in skeletal muscle through a PGC-1 α /ATF6 complex. **Cell Metabolism**, v. 13, n. 2, p. 160–169, 2011.

YU, Z. et al. Fiber type-specific nitric oxide protects oxidative myofibers against cachectic stimuli. **PLoS ONE**, v. 3, n. 5, 2008.

ZHOU, X. et al. Reversal of cancer cachexia and muscle wasting by ActRIIB antagonism leads to prolonged survival. **Cell**, v. 142, n. 4, p. 531–43, 2010.

Anexo 6, Cópia da aprovação (e adendo) no CEUA,

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE EDUCAÇÃO FÍSICA E ESPORTE

Of.CEUA/0112/EEFE/030412

Senhor(a) Pesquisador(a)

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo, em reunião ordinária realizada em 29 de março de 2012, **aprovou** o Protocolo de Pesquisa nº 2012/01 - Efeitos do treinamento físico aeróbio intervalado em alta intensidade no músculo esquelético de ratos inoculados com o tumor Walker 256: papel do sistema ubiquitina-proteassoma, sob sua responsabilidade.

Solicitamos a observância da apresentação do relatório parcial e final da pesquisa, em junho de 2013 e junho de 2014, respectivamente.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Edilamar Menezes de Oliveira
Coordenadora

Ilmo(a). Sr(a).
Prof(a). Dr(a). Patricia Chakur Brum
EEFEUSP

Av. Professor Mello Moraes, 65
CEP 05508-030 - São Paulo - SP - Brasil
Fone/fax: 55 11 3091-3097

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE EDUCAÇÃO FÍSICA E ESPORTE

Senhor(a) Pesquisador(a)

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo, em reunião ordinária realizada em 12 de dezembro de 2013, **aprovou** o relatório parcial e solicitação de alteração de título do Protocolo de Pesquisa nº 2012/01 - De "Efeitos do treinamento físico aeróbio intervalado em alta intensidade no músculo esquelético de ratos inoculados com o tumor Walker 256: papel do sistema ubiquitina-proteassoma" para "Caquexia do Câncer: efeitos do treinamento físico aeróbio sobre o músculo esquelético em modelo animal".
Solicitamos a observância da apresentação do final da pesquisa em junho de 2014.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Edilamar Menezes de Oliveira
Coordenadora

Ilmo(a). Sr(a).
Prof(a). Dr(a). Patrícia Chakur Brum