

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE EDUCAÇÃO FÍSICA E ESPORTE

Efeito da associação entre hipertensão arterial e câncer de Walker-256
sobre o fenótipo cardíaco e a progressão tumoral:
potencial terapêutico do treinamento físico aeróbio

Luis Felipe Rodrigues

SÃO PAULO

2024

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE EDUCAÇÃO FÍSICA E ESPORTE

Efeito da associação entre hipertensão arterial e câncer de Walker-256
sobre o fenótipo cardíaco e a progressão tumoral:
potencial terapêutico do treinamento físico aeróbio

Luis Felipe Rodrigues

São Paulo

2024

LUIS FELIPE RODRIGUES

Efeito da associação entre hipertensão arterial e câncer de Walker-256
sobre o fenótipo cardíaco e a progressão tumoral:
potencial terapêutico do treinamento físico aeróbio

Dissertação apresentada à Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo (EEFE-USP), como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Estudos Biodinâmicos da Educação Física e Esportes

Orientador: Professor Dr. Tiago Fernandes

São Paulo

2024

Catálogo da Publicação
Serviço de Biblioteca

Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo

Rodrigues, Luis Felipe

Efeito da associação entre hipertensão arterial e câncer de Walker-256 sobre o fenótipo cardíaco e a progressão tumoral: potencial terapêutico do treinamento físico aeróbio / Luis Felipe Rodrigues. – São Paulo: [s.n.], 2024. 132p.

Dissertação (Mestrado) - Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo.

Orientador: Prof. Dr. Tiago Fernandes

1. Treinamento físico aeróbio 2. Hipertensão arterial 3. Câncer

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: RODRIGUES, Luis Felipe.

Título: Efeito da associação entre hipertensão arterial e câncer de Walker-256 sobre o fenótipo cardíaco e a progressão tumoral: potencial terapêutico do treinamento físico aeróbio.

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

Data: ____/____/____.

Banca Examinadora:

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ **Julgamento:** _____

Dedico este trabalho principalmente à minha família, pois sem eles a concretização deste sonho seria impossível.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à minha família por todo o apoio e por nunca limitar meus sonhos, também por sempre estar presente nos momentos de fraqueza e insegurança. Muito obrigado!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Tiago Fernandes, por, desde a primeira reunião, acreditar em meu potencial e me proporcionar a oportunidade de aprender com ele. Agradeço por toda a confiança, paciência e ajuda ao longo do mestrado.

Agradeço a todos os colaboradores que fizeram parte do meu processo de aprendizado e tornaram este projeto viável, ensinando-me técnicas e tornando o processo mais fácil e agradável.

Aos integrantes do Laboratório de Bioquímica e Fisiologia, agradeço por todo o auxílio, conversas e aprendizados. Em especial, ao meu caro amigo Ney, agradeço por todo o suporte e por ser o amigo que é.

À secretária de Pós-graduação da Escola de Educação Física e Esporte, por todo suporte.

À FAPESP, CAPES e CNPq pelo apoio financeiro e incentivo a pesquisa.

“Demore o tempo que for para decidir o que você quer da vida, e depois que decidir não recue ante nenhum pretexto, porque o mundo tentará te dissuadir.”

Friedrich Nietzsche

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** – Fatores de risco comum das DCV e câncer. Adaptado de HANDY et al., (2018).....32
- FIGURA 2** – Mecanismos e fatores de risco associados a IC e câncer. Adaptado de KITSIS; RIQUELME; LAVANDERO., (2018).....37
- FIGURA 3** – Benefícios do exercício na progressão e recorrência do câncer. Adaptado de ASSI; DUFRESNE; RÉBILLARD., (2020).....42
- FIGURA 4** – Desenho experimental na primeira e segunda etapa do estudo. ...46
- FIGURA 5** – Aparato de treinamento físico de natação para ratos.....47
- FIGURA 6** – Efeitos da relação bidirecional da HA e câncer Walker-256 na caquexia. Os resultados de peso corporal (A) e peso livre de tumor (B) foram expressos em grama (g). O crescimento tumoral (C) foi avaliado em centímetros cúbicos (cm³). Os resultados de peso do tumor (D) e dos músculos sóleo (E), plantar (F) e gastrocnêmio (G) foram expressos em gramas (g) divididos pelo comprimento da tíbia (mm), para correção. Analisamos também a gordura retroperitoneal (G.Retro), gordura epididimal (G.Epi) e o baço, Figuras H, I e J. Grupos: WkyC, indica Wistar Kyoto Controle (n = 12); WkyT, Wistar Kyoto Controle Tumor (n = 11); ShrC, Shr Controle (n = 12) e ShrT Tumor (n = 9). Os resultados são expressos como média ± EPM. Análise estatística: Teste T e Two-way ANOVA, teste post hoc de Tukey. Diferença significativa vs. *WkyC, p < 0,05; **WkyC, p < 0,01; ***WkyC, p < 0,001; ****WkyC, p < 0,0001; †ShrC, p < 0,05; ‡ShrC, p < 0,01; \$WkyT, p < 0,05; \$\$WkyT p < 0,01; \$\$\$WkyT, p < 0,0001.60
- FIGURA 7** – Influência da associação da HA e tumor Walker-256 na capacidade funcional. Os resultados de distância foram expressos em metros (m) e os resultados de tempo de teste foram expressos em minutos (min). Em relação ao grip strength os resultados foram expressos em gramas (g). Grupos: WkyC, indica Wistar Kyoto Controle (n = 12);

WkyT, Wistar Kyoto Controle Tumor (n = 11); ShrC, Shr Controle (n = 12) e ShrT Tumor (n = 9). Os resultados são expressos como média \pm EPM. Análise estatística: Two-way ANOVA, teste post hoc de Tukey. Diferença significativa vs. # indica a diferença entre pré-teste e pós-teste. (#) p < 0,05; (####) p < 0,0001. *WkyC, p < 0,05; **WkyC, p < 0,01; ††ShrC, p < 0,001; ‡‡ShrC, p < 0,0001; \$WkyT, p < 0,05..... 62

FIGURA 8 – Medidas cardiovasculares na associação da HA e câncer. Pressão arterial sistólica (PAS), foi expressa em milímetros de mercúrio (mmHg). A frequência cardíaca (FC) foi expressa em batimentos por minuto (bpm). Grupos: WkyC, indica Wistar Kyoto Controle (n = 12); WkyT, Wistar Kyoto Controle Tumor (n = 11); ShrC, Shr Controle (n = 12) e ShrT Tumor (n = 9). Os resultados são expressos como média \pm EPM. Análise estatística: Two-way ANOVA, teste post hoc de Tukey. Diferença significativa vs. # indica a diferença entre pré-teste e pós-teste. (####) p < 0,0001; ***WkyC, p < 0,001; ****WkyC, p < 0,0001; \$WkyT, p < 0,05; \$\$\$\$WkyT, p < 0,0001; ††ShrC, p < 0,0001.....64

FIGURA 9 – Função cardíaca pelo ecocardiograma. Fração de ejeção (FE) (A) e fração de encurtamento (FS) (B) foram expressas em porcentagem (%). Tempo de Contração Isovolumétrico (IVCT) (C), tempo de relaxamento isovolumétrico (IVRT) (D) expresso em milissegundo (ms). A desaceleração da onda E (MV Decel) (E) também foi expressa em milissegundo (ms). Razão das ondas E/A (MV E/A) (F). Índice de performance miocárdica (TEI) (G). Grupos: WkyC, indica Wistar Kyoto Controle (n = 12); WkyT, Wistar Kyoto Controle Tumor (n = 11); ShrC, Shr Controle (n = 12) e ShrT Tumor (n = 9). Os resultados são expressos como média \pm EPM. Análise estatística: Two-way ANOVA, teste post hoc de Tukey. Diferença significativa vs. *WkyC, p < 0,05; **WkyC, p < 0,01; ***WkyC, p < 0,001; \$WkyT, p < 0,05; \$\$\$\$WkyT, p < 0,01..... 66

FIGURA 10 – Alterações morfológicas cardíacas na associação da HA e câncer.

Os resultados foram corrigidos pelo comprimento da tíbia representado em milímetros (mm). Ventrículo esquerdo (VE/tíbia) (A), ventrículo direito (VD/tíbia) (B), e átrios (Átrios/tíbia) (C) foram expressos em grama (g) divididos pelo comprimento da tíbia (mm). A massa do ventrículo esquerdo corrigida (D) foi expressa em miligrama (mg), o volume diastólico final (VDF) (E) e volume sistólico final (VSF) (F) foram medidos em microlitros (μL), o septo interventricular na diástole (G) e na sístole (H) foram expressos em milímetros (mm), diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (DDVE) (I), diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo (DSVE) (J) e parede posterior (PP) na diástole e sístole (K,L) foram expressas em milímetros (mm) e espessura relativa da parede (ERP) (M). A área de secção transversa (N) foi expressa em micrômetro ao quadrado (μm^2), imagem representativa da coloração com WGA (O). Para representação do colágeno total (P) utilizamos a fração do volume expressa em micrômetro (μm), imagem representativa dos cortes corados com Picrossirius-red (Q). Escala representativa de 100 micrômetros. Grupos: WkyC, indica Wistar Kyoto Controle (n = 12); WkyT, Wistar Kyoto Controle Tumor (n = 11); ShrC, Shr Controle (n = 12) e ShrT Tumor (n = 9). Os resultados são expressos como média \pm EPM. Análise estatística: Two-way ANOVA, teste post hoc de Tukey. Diferença significativa vs. *WkyC, p < 0,05; **WkyC, p < 0,01; ***WkyC, p < 0,001; ****WkyC, p < 0,0001; †ShrC, p < 0,05; ††ShrC, p < 0,001; †††ShrC, p < 0,0001; \$\$WkyT p < 0,01; \$\$\$WkyT p < 0,001; \$\$\$\$WkyT, p < 0,0001.....74

FIGURA 11 – Expressão gênica de proteínas sarcoméricas do remodelamento cardíaco patológico. O resultado do normalizador 18s (A) foi expresso utilizando o método de limiar comparativo de ciclos (ct). Os resultados da expressão gênica foram expressos em porcentagem do controle (% do controle) para os genes: α MHC (B) e β MHC (C). Já a razão

α MHC/ β MHC (D) foi expressa em unidade arbitrária (UA) Grupos: WkyC, indica Wistar Kyoto Controle (n = 12); WkyT, Wistar Kyoto Controle Tumor (n = 11); ShrC, Shr Controle (n = 12) e ShrT Tumor (n = 9). Os resultados são expressos como média \pm EPM. Análise estatística: Two-way ANOVA, teste post hoc de Tukey. Diferença significativa vs. ***WkyC, p < 0,001; †ShrC, p < 0,05; ‡ShrC, p < 0,01.....75

FIGURA 12 – Expressão gênica de marcadores inflamatórios cardíacos na associação HA e câncer. O resultado do normalizador 18s foi expresso utilizando o método de limiar comparativo de ciclos (2- $\Delta\Delta$ Ct). Os resultados da expressão gênica foram expressos em porcentagem do controle (% do controle) para os genes: TNF α , IL-6 e IL-10. Grupos: WkyC, indica Wistar Kyoto Controle (n = 12); WkyT, Wistar Kyoto Controle Tumor (n = 11); ShrC, Shr Controle (n = 12) e ShrT Tumor (n = 9). Os resultados são expressos como média \pm EPM. Análise estatística: Two-way ANOVA, teste post hoc de Tukey. Diferença significativa vs. *WkyC, p < 0,05; ***WkyC, p < 0,001; ****WkyC, p < 0,0001; †ShrC, p < 0,05; ††ShrC, p < 0,001; ‡‡ShrC, p < 0,0001; \$\$WkyT p < 0,01; \$\$\$WkyT, p < 0,0001.....77

FIGURA 13 – Análises de síntese e degradação proteica cardíaca. As proteínas totais foram normalizadas pelo GAPDH. Os resultados da expressão proteica foram expressos em porcentagem do controle (% do controle) para as proteínas: PI3K, AKT total e fosforilada, FoxO1, GS3K total e fosforilada, 4EBP1 total e fosforilada, eIF4E total e fosforilada, p-70 total e fosforilada e GATA4. Grupos: WkyC, indica Wistar Kyoto Controle (n = 12); WkyT, Wistar Kyoto Controle Tumor (n = 8); ShrC, Shr Controle (n = 12) e ShrT Tumor (n = 8). Os resultados são expressos como média \pm EPM. Análise estatística: Two-way ANOVA, teste post hoc de Tukey. Diferença significativa vs. *WkyC, p < 0,05;

WkyC, $p < 0,01$; **WkyC, $p < 0,0001$; ‡‡ShrC, $p < 0,0001$80

FIGURA 14 – Análises de proteínas de sobrevivência e apoptose celular cardíaca. As proteínas totais foram normalizadas pelo GAPDH. Os resultados da expressão proteica foram expressos em porcentagem do controle (% do controle) para as proteínas: BAD, BCL-2 e BCL-x. Grupos: WkyC, indica Wistar Kyoto Controle (n = 10); WkyT, Wistar Kyoto Controle Tumor (n = 8); ShrC, Shr Controle (n = 12) e ShrT Tumor (n = 8). Os resultados são expressos como média ± EPM. Análise estatística: Two-way ANOVA, teste post hoc de Tukey.....82

FIGURA 15 – Expressão de miRNAs cardíaco e circulante. O U6 foi utilizado para normalizar os miRNAs cardíacos e o miR-39 foi utilizado para normalizar o miRNA circulante. Os resultados da expressão dos miRNAs foram expressos em porcentagem do controle (% do controle) para os miRNAs cardíacos: -208a (A), -208b (B) e -499 (C) e para o miRNA circulante: -208a (E). Grupos: WkyC, indica Wistar Kyoto Controle (n = 12); WkyT, Wistar Kyoto Controle Tumor (n = 11); ShrC, Shr Controle (n = 12) e ShrT Tumor (n = 9). Os resultados são expressos como média ± EPM. Análise estatística: Two-way ANOVA, teste post hoc de Tukey. Diferença significativa vs. *WkyC, $p < 0,05$; **WkyC, $p < 0,01$; ****WkyC, $p < 0,0001$; ††ShrC, $p < 0,001$; \$WkyT $p < 0,05$; \$\$\$WkyT $p < 0,001$84

FIGURA 16 – Efeito da associação da HÁ e câncer sobre o fenótipo cardíaco e incapacidade física85

FIGURA 17 – Efeitos do TFA na relação bidirecional da HA e câncer Walker-256 e redução dos efeitos da caquexia. Os resultados de peso corporal (A) e peso livre de tumor (B) foram expressos em grama (g). O crescimento tumoral (C) foi avaliado em centímetros cúbicos (cm³). Os resultados de peso do tumor (D) e dos músculos sóleo (E), plantar

(F) e gastrocnêmio (G) foram expressos em gramas (g) divididos pelo comprimento da tíbia (mm), para correção. Analisamos também a gordura retroperitoneal (G.Retro), gordura epididimal (G.Epi) e o baço, Figuras H, I e J. Grupos: WkyT, indica Wistar Kyoto Tumor (n = 13); WkyT-Ex, Wistar Kyoto Tumor Exercício (n = 12); ShrT, Shr Tumor (n = 11) e ShrT-Ex, Tumor Exercício (n = 10). Os resultados são expressos como média ± EPM. Análise estatística: Teste T e Two-way ANOVA, teste post hoc de Tukey. Diferença significativa vs. *WkyT, p < 0,05; **WkyT, p < 0,01; ***WkyT, p < 0,001; ****WkyT, p < 0,0001; †ShrT, p < 0,05; ††ShrT, p < 0,001; ‡‡ShrT, p < 0,0001; \$\$WkyT-Ex p < 0,01.....90

FIGURA 18 – Efeito do TFA sobre a capacidade funcional na associação entre HA e câncer. Os resultados de distância foram expressos em metros (m) e os resultados de tempo de teste foram expressos em minutos (min). Em relação ao grip strength os resultados foram expressos em gramas (g). A Citrato Sintase foi expressa em valores de nmol. min⁻¹. mg de proteína⁻¹. Grupos: WkyT, indica Wistar Kyoto Tumor (n = 14); WkyT-Ex, Wistar Kyoto Tumor Exercício (n = 12); ShrT, Shr Tumor (n = 14) e ShrT-Ex, Tumor Exercício (n = 11). Os resultados são expressos como média ± EPM. Análise estatística: Two-way ANOVA, teste post hoc de Tukey. Diferença significativa vs. # indica a diferença entre pré-teste e pós-teste. (####) p < 0,0001. *WkyT, p < 0,05; **WkyT, p < 0,01; ***WkyT, p < 0,001; ****WkyT, p < 0,0001; ‡‡ShrT, p < 0,0001.....93

FIGURA 19 – Medidas cardiovasculares na associação da HA e câncer e TFA. Pressão arterial sistólica (PAS), foi expressa em milímetros de mercúrio (mmHg). A frequência cardíaca (FC) foi expressa em batimentos por minuto (bpm). Grupos: WkyT, indica Wistar Kyoto Tumor (n = 13); WkyT-Ex, Wistar Kyoto Tumor Exercício (n = 11); ShrT, Shr Tumor (n = 13) e ShrT-Ex, Tumor Exercício (n = 12). Os

resultados são expressos como média \pm EPM. Análise estatística: Two-way ANOVA, teste post hoc de Tukey. Diferença significativa vs. ****WkyT, $p < 0,0001$; \$WkyT-Ex, $p < 0,05$95

FIGURA 20 – Função cardíaca pelo ecocardiograma. Fração de ejeção (FE) (A) e fração de encurtamento (FS) (B) foram expressas em porcentagem (%). Tempo de Contração Isovolumétrico (IVCT) (C), tempo de relaxamento isovolumétrico (IVRT) (D) expresso em milissegundo (ms). A desaceleração da onda E (MV Decel) (E) também foi expressa em milissegundo (ms). Razão das ondas E/A (MV E/A) (F). Índice de performance miocárdica (TEI) (G). Grupos: WkyT, indica Wistar Kyoto Tumor (n = 14); WkyT-Ex, Wistar Kyoto Tumor Exercício (n = 12); ShrT, Shr Tumor (n = 12) e ShrT-Ex, Tumor Exercício (n = 12). Os resultados são expressos como média \pm EPM. Análise estatística: Two-way ANOVA, teste post hoc de Tukey. Diferença significativa vs. *WkyT, $p < 0,05$; \$WkyT-Ex, $p < 0,05$97

FIGURA 21 – Alterações morfológicas cardíacas na relação bidirecional HA e câncer e o papel do TFA. Os resultados foram corrigidos pelo comprimento da tíbia representado em milímetros (mm). Ventrículo esquerdo (VE/tíbia) (A), ventrículo direito (VD/tíbia) (B), e átrios (Átrios/tíbia) (C) foram expressos em grama (g) divididos pelo comprimento da tíbia (mm). A massa do ventrículo esquerdo corrigida (D) foi expressa em miligrama (mg), o volume diastólico final (VDF) (E) e volume sistólico final (VSF) (F) foram medidos em microlitros (μ L), o septo interventricular na diástole (G) e na sístole (H) foram expressos em milímetros (mm), diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (DDVE) (I), diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo (DSVE) (J) e parede posterior (PP) na diástole e sístole (K,L) foram expressas em milímetros (mm) e espessura relativa da parede (ERP)

(M). Grupos: WkyT, indica Wistar Kyoto Tumor (n = 14); WkyT-Ex, Wistar Kyoto Tumor Exercício (n = 12); ShrT, Shr Tumor (n = 12) e ShrT-Ex, Tumor Exercício (n = 12). Os resultados são expressos como média ± EPM. Análise estatística: Two-way ANOVA, teste post hoc de Tukey. Diferença significativa vs. *WkyT, p < 0,05; **WkyT, p < 0,01; ***WkyT, p < 0,001; ****WkyT, p < 0,0001; †ShrT, p < 0,05; ‡ShrT, p < 0,01; \$WkyT-Ex p < 0,05; \$\$WkyT-Ex p < 0,01; \$\$\$WkyT-Ex, p < 0,001.....102

FIGURA 22 – Expressão gênica de marcadores de remodelamento cardíaco patológico e o efeito do TFA. O resultado do normalizador 18s (A) foi expresso utilizando o método de limiar comparativo de ciclos (Ct). Os resultados da expressão gênica foram expressos em porcentagem do controle (% do controle) para os genes: αMHC (B) e βMHC (C). Já a razão αMHC/βMHC (D) foi expressa em unidade arbitrária (UA) Grupos: WkyT, indica Wistar Kyoto Tumor (n = 13); WkyT-Ex, Wistar Kyoto Tumor Exercício (n = 12); ShrT, Shr Tumor (n = 12) e ShrT-Ex, Tumor Exercício (n = 10). Os resultados são expressos como média ± EPM. Análise estatística: Two-way ANOVA, teste post hoc de Tukey. Diferença significativa vs. ***WkyT, p < 0,001; ****WkyT, p < 0,0001; ††ShrT, p < 0,0001; \$\$WkyT-Ex p < 0,01; \$\$\$WkyT-Ex, p < 0,001.....103

FIGURA 23 – Expressão gênica de marcadores inflamatórios cardíacos e o TFA. O resultado do normalizador 18s foi expresso utilizando o método de limiar comparativo de ciclos (Ct). Os resultados da expressão gênica foram expressos em porcentagem do controle (% do controle) para os genes: TNFα, IL-6 e IL-10. Grupos: WkyT, indica Wistar Kyoto Tumor (n = 13); WkyT-Ex, Wistar Kyoto Tumor Exercício (n = 12); ShrT, Shr Tumor (n = 11) e ShrT-Ex, Tumor Exercício (n = 10). Os resultados são expressos como média ± EPM. Análise estatística: Two-way

ANOVA, teste post hoc de Tukey. Diferença significativa vs. *WkyC, $p < 0,05$; **WkyC, $p < 0,01$; †ShrC, $p < 0,05$; \$WkyT $p < 0,05$ 105

FIGURA 24 – Análises de síntese e degradação proteica cardíaca e o efeito do TFA. As proteínas totais foram normalizadas pelo GAPDH. Os resultados da expressão proteica foram expressos em porcentagem do controle (% do controle) para as proteínas: PI3K, AKT total e fosforilada, GS3K total e fosforilada, 4EBP1 total e fosforilada e GATA4. Grupos: WkyT, indica Wistar Kyoto Tumor ($n = 9$); WkyT-Ex, Wistar Kyoto Tumor Exercício ($n = 9$); ShrT, Shr Tumor ($n = 9$) e ShrT-Ex, Tumor Exercício ($n = 9$). Os resultados são expressos como média \pm EPM. Análise estatística: Two-way ANOVA, teste post hoc de Tukey. Diferença significativa vs. **WkyC, $p < 0,01$; \$\$WkyT $p < 0,01$ 107

FIGURA 25 – Análises de proteínas de sobrevivência e apoptose celular cardíaca. As proteínas totais foram normalizadas pelo GAPDH. Os resultados da expressão proteica foram expressos em porcentagem do controle (% do controle) para as proteínas: BAD e Bcl-x. Grupos: WkyT, indica Wistar Kyoto Tumor ($n = 9$); WkyT-Ex, Wistar Kyoto Tumor Exercício ($n = 9$); ShrT, Shr Tumor ($n = 9$) e ShrT-Ex, Tumor Exercício ($n = 9$). Os resultados são expressos como média \pm EPM. Análise estatística: Two-way ANOVA, teste post hoc de Tukey..... 108

FIGURA 26 – Expressão de miRNAs cardíaco e circulante e o papel o TFA. O U6 foi utilizado para normalizar os miRNAs cardíacos e o miR-39 foi utilizado para normalizar o miRNA circulante. Os resultados da expressão dos miRNAs foram expressos em porcentagem do controle (% do controle) para os miRNAs cardíacos: -208a (A), -208b (B) e -499 (C) e para o miRNA circulante: -208a (E). Grupos: WkyT, indica Wistar Kyoto Tumor ($n = 13$); WkyT-Ex, Wistar Kyoto Tumor Exercício

(n = 12); ShrT, Shr Tumor (n = 11) e ShrT-Ex, Tumor Exercício (n = 10). Os resultados são expressos como média ± EPM. Análise estatística: Two-way ANOVA, teste post hoc de Tukey. Diferença significativa vs. *WkyT, p < 0,05; **WkyT, p < 0,01; ***WkyT, p < 0,001; ****WkyT, p < 0,0001; ††ShrT, p < 0,001; \$WkyT-Ex p < 0,05.....110

FIGURA 27 – Efeito do TFA na associação HA e câncer prevenindo a atrofia, disfunção do VE e incapacidade física.....111

LISTA DE SIGLAS, ABREVIações E SÍMBULOS

AKT: Proteína quinase B

BCI-x Linfoma de células B-extragrande

BCI-2: Linfoma de células B2

BPM: Batimentos por minuto

cDNA: DNA complementar

CEUA: Comitê de Ética no Uso de Animais

CS: Citrato sintase

DCV: Doenças cardiovasculares

DDVE: Diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo

DSVE: Diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo

eIF4E: Fator de iniciação da tradução eucariótica 4E

EPM: Erro padrão da média

ERP: Espessura relativa da parede

FC: Frequência cardíaca

FE: Fração de ejeção

FoxO1: Fatores de transcrição forkhead box O

FS: Fração de encurtamento

GAPDH: Glicose-3-fosfato desidrogenase

GATA4: Fator de transcrição GATA-4

GS3K: Glicogênio sintase quinase

HA: Hipertensão arterial

IC: Insuficiência Cardíaca

ICB-USP: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

ICFEp: Insuficiência cardíaca de fração de ejeção preservada

IL-6: Interleucina 6

IL-10: Interleucina 10

INCA: Instituto Nacional de Câncer

IVCT: Tempo de contração isovolumétrico

IVRT: Tempo de relaxamento isovolumétrico

MHC: Miosina de cadeia pesada

miRNA: microRNAs

mRNA: RNA mensageiro

MV Decel: Desaceleração da onda E

MV E/A: razão E/A

PA: Pressão arterial

PAS: Pressão arterial sistólica

PI3K: fosfatidilinositol-3-quinase

PP: Parede posterior

p70S6K: p70 ribossomal S6 kinase

RT-qPCR: PCR quantitativo em tempo real

Shr: Ratos espontaneamente hipertensos

ShrC: Ratos espontaneamente hipertenso Controle

ShrT: Ratos espontaneamente hipertenso Tumor

ShrT-Ex: Ratos espontaneamente hipertenso Tumor Exercício

TEI: Índice de performance miocárdica

TFA: Treinamento físico aeróbio

TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa

VD: Ventrículo direito

VE: Ventrículo esquerdo

VDF: Volume diastólico final

VSF: Volume sistólico final

Wky: Ratos Wistar Kyoto

WkyC: Wistar Kyoto Controle

WkyT: Wistar Kyoto Tumor

WkyT-Ex: Wistar Kyoto Tumor Exercício

4EBP1: Proteína 1 ligante do fator de iniciação eucariótico 4E

RESUMO

Rodrigues, L.F. **Efeito da associação entre hipertensão arterial e câncer de Walker-256 sobre o fenótipo cardíaco e a progressão tumoral: potencial terapêutico do treinamento físico aeróbio.** 2024. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Educação Física e Esporte, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2024.

As doenças cardiovasculares (DCV), seguida pelos cânceres são, as principais causas de morte no mundo; reconhecidas por serem doenças complexas e de causa multifatorial, e que apresentam uma interação e fatores de risco em comum. Nas últimas décadas, a cardio-oncologia tem se voltado para prevenção e tratamento de DCV em pacientes sobreviventes do câncer, como resultado da cardiotoxicidade de agentes antineoplásicos. Por outro lado, há um crescente corpo de evidências epidemiológicas demonstrando que DCV são fatores pró-oncogênicos, uma vez que pacientes com DCV apresentam maior incidência de câncer comparado com populações saudáveis. Uma associação significativa entre hipertensão arterial (HA) e incidência/ mortalidade por câncer em humanos tem sido descrita. É possível que a relação bidirecional das doenças possa potencializar os danos cardíacos, entretanto pouco se sabe sobre a associação das mesmas e os mecanismos relacionados com esse fenômeno. O treinamento físico aeróbio (TFA) vem sendo utilizado como uma importante terapia não farmacológica para aliviar os sintomas, melhorar a tolerância ao exercício, à qualidade de vida e reduzir a hospitalização de pacientes com DCV e câncer. Contudo, os efeitos do TFA sobre as repercussões cardíacas na associação das DCV com o câncer são desconhecidos. Assim, o objetivo do presente estudo foi investigar a associação entre a HA e o câncer nas alterações fenotípicas cardíaca e na progressão tumoral em ratos e verificar o papel terapêutico do TFA sobre a cardiomiopatia e a incapacidade funcional induzida pela relação bidirecional entre as doenças. Tanto o modelo de HA com animais espontaneamente hipertensos (Shr) quanto de câncer com o tumor de Walker-256 foram selecionados devido à similaridade da sua fisiopatogenia em humanos. Foram utilizados 50 ratos Wistar Kyoto e 50 Shr. O implante do carcinoma de Walker-256 foi efetuado no tecido subcutâneo da região do flanco direito. Os animais foram treinados durante 6 semanas, sessões de 60 min, 1 vez ao dia, 5 vezes por semana, com aumento gradual da sobrecarga de trabalho. Foi avaliado: pressão arterial e a frequência cardíaca de repouso, tolerância ao esforço físico máximo, função e estrutura ventricular, crescimento tumoral, massa cardíaca e muscular esquelética, percentual de caquexia e atividade da enzima citrato sintase. Ainda mensuramos o diâmetro dos cardiomiócitos, fibrose cardíaca e razão capilar por fibra cardíaca pelo método histológico. Expressão de genes para hipertrofia cardíaca patológica e conteúdo de colágeno, família do miRNA-208 e análise da expressão de proteínas para vias de sobrevivência e apoptose celular. As análises estatísticas foram realizadas pelo *Software* GraphPad (Califórnia, EUA).

Palavras-chave: Treinamento físico aeróbio; hipertensão arterial; câncer.

ABSTRACT

Rodrigues, L.F. **Effect of the association between arterial hypertension and Walker-256 cancer on cardiac phenotype and tumor progression: therapeutic potential of aerobic exercise.** 2024. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Educação Física e Esporte, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2024.

Cardiovascular diseases (CVD) followed by cancers are the leading causes of death worldwide; recognized for being complex and multifactorial diseases that share common risk factors and interactions. In recent decades, cardio-oncology has focused on the prevention and treatment of CVD in cancer survivors, stemming from the cardiotoxicity of antineoplastic agents. On the other hand, there is a growing body of epidemiological evidence demonstrating that CVD acts as pro-oncogenic factors, as patients with CVD have a higher incidence of cancer compared to healthy populations. A significant association between arterial hypertension (AH) and cancer incidence/mortality in humans has been described. It is possible that the bidirectional relationship of these diseases may potentiate cardiac damage, yet little is known about their association and the mechanisms related to this phenomenon. Aerobic exercise (AE) has been used as an important non-pharmacological therapy to alleviate symptoms, improve exercise tolerance, quality of life, and reduce hospitalization for patients with CVD and cancer. However, the effects of APT on cardiac repercussions in the association of CVD with cancer are unknown. Thus, the aim of this study was to investigate the association between AH and cancer in cardiac phenotypic alterations and tumor progression in rats and to verify the therapeutic role of AE on cardiomyopathy and functional impairment induced by the bidirectional relationship between the diseases. Both the AH model with spontaneously hypertensive rats (SHR) and the cancer model with Walker-256 tumor were selected due to the similarity of their pathophysiology in humans. 50 Wistar Kyoto rats and 50 SHR were used. Walker-256 carcinoma implantation was performed in the subcutaneous tissue of the right flank region. The animals were trained for 6 weeks, 60-minute sessions, once a day, 5 times a week, with a gradual increase in workload. The following were evaluated: blood pressure and resting heart rate, maximum physical exertion tolerance, ventricular function and structure, tumor growth, cardiac and skeletal muscle mass, percentage of cachexia, and citrate synthase enzyme activity. We also measured cardiomyocyte diameter, cardiac fibrosis, and capillary-to-fiber ratio by histological methods. Expression of genes for pathological cardiac hypertrophy and collagen content, miRNA-208 family, and protein expression analysis for survival pathways and cellular apoptosis. Statistical analyses were performed using GraphPad Software (California, USA).

Key-words: Aerobic exercise; arterial hypertension; cancer.

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	24
1.2 Justificativa.....	27
2. OBJETIVOS.....	29
2.1 Geral.....	29
2.2 Específicos	29
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	30
3.1 Epidemiologia das doenças cardiovasculares e do câncer	30
3.2 Caracterização da hipertensão arterial e do câncer	32
3.3 Remodelamento e função cardíaca na hipertensão arterial e no câncer.....	35
3.4 Efeito do exercício físico na hipertensão arterial e no câncer	40
4. MÉTODOS.....	44
4.1 Comissão de ética no uso de animais	44
4.2 Animais.....	44
4.3 Implante tumoral.....	44
4.4 Desenho experimental.....	45
4.5 Protocolo de treinamento físico aeróbio	46
4.6 Avaliação da pressão arterial e da frequência cardíaca de repouso	47
4.7 Avaliação de força e tolerância ao esforço físico máximo	47
4.8 Avaliação da função e estrutura ventricular- ecocardiograma.....	48
4.9 Crescimento tumoral	49
4.10 Indicadores de <i>endpoint</i> no manejo animal para controle dos níveis de dor e sofrimento	49
4.11 Coleta das amostras	50
4.12 Avaliação da massa cardíaca e muscular esquelética.....	50
4.13 Avaliação da atividade da enzima citrato sintase.....	51
4.14 Avaliação da área de secção transversa dos cardiomiócitos pelo método imunohistoquímica	51
4.15 Avaliação da fibrose cardíaca pelo método histológico.....	52
4.16 Expressão de genes e miRNAs	52
4.16.1 Extração de RNA total cardíaco e circulante	52
4.16.2 Síntese de cDNA para expressão de genes e miRNAs.....	52

4.16.3	Reação de polimerase em cadeia em tempo real (RT-PCR) para expressão de genes e miRNAs	53
4.17	Análise da expressão de proteínas	54
4.18	Estatística	55
5.	RESULTADOS DISCUTIDOS	56
5.1	Caracterização do modelo de caquexia no tumor Walker-256 associado a hipertensão arterial	56
5.2	Capacidade funcional na relação bidirecional da HA e câncer	61
5.3	Medidas cardiovasculares na relação bidirecional da HA e câncer	62
5.4	Análise de função cardíaca na relação bidirecional da HA e câncer	64
5.5	Análise de morfologia cardíaca na relação bidirecional da HA e câncer	67
5.6	Proteínas sarcoméricas de remodelamento cardíaco patológico	74
5.7	Marcadores inflamatórios cardíacos na relação bidirecional da HA e câncer	75
5.8	Análises de síntese e degradação proteica cardíaca	77
5.9	Análises de proteínas de sobrevivência e apoptose celular cardíaca	80
5.10	Família do microRNA-208a cardíaco e circulante na progressão tumoral	82
6.	Resultados da segunda etapa do estudo	85
6.1	Modelo de caquexia no tumor Walker-256 associado a hipertensão arterial e o efeito do treinamento físico aeróbio	85
6.2	Efeito do TFA sobre a capacidade física na relação bidirecional da HA e câncer	90
6.3	Efeito do TFA nas medidas cardiovasculares	93
6.4	Efeito do TFA sobre a função cardíaca na relação bidirecional da HA e câncer	95
6.5	Análise de morfologia cardíaca	97
6.6	Influência do TFA nas proteínas sarcoméricas de remodelamento cardíaco patológico	102
6.7	Efeito do TFA sobre os marcadores inflamatórios cardíacos na associação HA e câncer	104
6.8	Análises de síntese e degradação proteica cardíaca e o efeito do TFA	105
6.9	Análises de proteínas de sobrevivência e apoptose celular cardíaca	107
6.10	Família do microRNA-208a cardíaco e circulante e o papel do TFA	108
7	Conclusão	112
8	REFERÊNCIAS	113
9	ANEXO	130

1. INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares (DCV), seguida pelos cânceres, são as principais causas de morte em todo o mundo com $\cong 18,56$ e $10,8$ milhões de óbitos, respectivamente (RITCHIE. H; ROSER. M, 2019; VIRANI et al., 2020).

Dentre os fatores de risco para DCV, a hipertensão arterial essencial (HA) tem grande destaque, pois tem alta prevalência e grande participação na mortalidade cardiovascular (ROTH et al., 2020). A prevalência global de HA aumentou de forma constante nas últimas 3 décadas, assim como o número total de mortes, devido a esta doença (ROTH et al., 2020). Sendo assim, a HA é a doença cardiovascular mais prevalente em todo o mundo, afetando aproximadamente 1,28 bilhões de indivíduos com idades entre 30 a 79 anos (MANCIA et al., 2023). A HA continua sendo também o principal fator de risco modificável para os óbitos decorrentes de doenças cardiovasculares em todo o mundo (VADUGANATHAN et al., 2022). Globalmente $\cong 27\%$ a 40% dos indivíduos portadores de HA apresentam uma não aderência ao tratamento farmacológico (LEE et al., 2022b). Dados norte-americanos mostram que nos EUA a HA contribuiu para $\cong 395.000$ mortes cardiovasculares (45% de todas as mortes cardiovasculares) (VIRANI et al., 2020). No Brasil, o cenário não é diferente e, a HA está presente em $\cong 36$ milhões de indivíduos adultos (32,5%), sendo sua maior prevalência em idosos (60%), contribuindo direta ou indiretamente para a mortalidade por DCV ($\cong 50\%$ de todas as mortes cardiovasculares) (MALACHIAS et al., 2016).

Estudos demonstram que as DCV e o câncer estão intimamente relacionadas, além de compartilharem diversos fatores de risco. O termo relação bidirecional indica que as DCV aumentam a probabilidade de desenvolver o câncer (AMERI; BERTERO; MEIJERS, 2023; BERTERO et al., 2022; DE BOER et al., 2020; GHIGO et al., 2023; JOVANI et al., 2022; KOELWYN et al., 2022; VENTURINI et al., 2020) e vice-versa Seretis et al. (SERETIS et al., 2019) publicaram uma revisão sistemática e meta-análise mostrando que a HA pode favorecer a incidência e o desenvolvimento de 18 tipos de cânceres, sendo os mais destacados no estudo o de rim, o de colorretal e o de mama. Para o câncer de mama, foram encontradas evidências de que a HA está associada a

um risco 10% maior de câncer e para mulheres pós-menopausa um risco de 38% maior comparado com normotensos. Além da HA a insuficiência cardíaca (IC) também vem sendo destacada, por apresentar uma maior incidência de câncer comparados a indivíduos sem IC, o estudo apresentou um maior risco para os cânceres de mama, câncer de pulmão, câncer hematológico e câncer colorretal (JAISWAL et al., 2023). Ainda, a HA é descrita como um dos efeitos adversos comuns durante o tratamento oncológico (COHEN et al., 2023). Estudos mostram que cerca de um terço dos pacientes com câncer desenvolvem HA durante a doença, emergindo rapidamente como uma das principais causas de morte e incapacidade em pacientes com câncer (MOHAMMED et al., 2021; TINI et al., 2019). Embora a crescente importância clínica e a publicação de estudos destacando o efeito bidirecional entre as duas doenças, pouco se sabe sobre a associação das mesmas (GHIGO et al., 2023; JOVANI et al., 2022; SCOTT et al., 2016; SERETIS et al., 2019; TINI et al., 2019; VENTURINI et al., 2020). Dada a grande relevância da cardio-oncologia, uma agenda de pesquisa que aborda sistematicamente a prevalência, a patogênese e o tratamento de DCV em estágio inicial do câncer é importante e necessário (HAJJAR et al., 2020).

Recentemente, um estudo se propôs a investigar se o infarto agudo do miocárdio teria influência na fisiopatologia do câncer de mama. Os pesquisadores mostraram que o infarto acelerou o crescimento tumoral com um aumento de aproximadamente duas vezes no volume e peso do tumor, mostrando que uma doença pode gerar o agravamento da outra (KOELWYN et al., 2020). De modo similar, o câncer vem sendo descrito por gerar danos cardiovasculares, como perda de massa cardíaca (RAUSCH et al., 2021; TONETO et al., 2016) e disfunção, associado a uma redução da contratilidade, frequência cardíaca e aumento da fibrose (FERNANDES et al., 2020; SCHMIDT et al., 2018).

Embora grandes avanços no entendimento das DCV e cânceres vêm sendo demonstrados, os mecanismos moleculares envolvidos nas anormalidades cardíacas permanecem pouco elucidados, bem como na relação bidirecional de ambas as doenças (GHIGO et al., 2023; JOVANI et al., 2022; KOELWYN et al., 2022). Com as novas descobertas no âmbito da genética nas últimas décadas, várias áreas da comunidade científica têm voltado suas atenções para uma importante classe de reguladores gênicos denominados de microRNAs (miRNAs). Os miRNAs tem ganhado grande destaque por

regularem pós-transcricionalmente a expressão de seus genes alvo (mRNAs) e estarem envolvidos com o desenvolvimento e agravamento de patologias, como a HA e o câncer (AMBROS, 2004; BARTEL, 2004; IMPROTA-CARIA et al., 2024; WANG et al., 2021). Desta forma, os efeitos da relação entre a HA e o câncer no âmbito funcional, morfológico e molecular ainda são desconhecidos e a elucidação desses processos e a identificação de novos alvos na patogênese de ambas as doenças é uma estratégia muito valiosa que pode, eventualmente, levar ao desenvolvimento de novas abordagens para o diagnóstico precoce e/ou tratamento das doenças.

O treinamento físico aeróbio (TFA) vem sendo utilizado e recomendado como uma importante terapia não farmacológica para aliviar os sintomas, melhorar a tolerância ao exercício, à qualidade de vida e reduzir a hospitalização e mortalidade de pacientes com DCV e câncer (HEDMAN et al., 2022; HU et al., 2022). A capacidade aeróbia vem sendo utilizada como um grande indicador de morte precoce tanto para indivíduos saudáveis quanto para aqueles com doenças associadas (BOOTH et al., 2017; MYERS et al., 2002). Em comparação com pessoas inativas, homens que atingiram o nível de atividade física recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) tiveram 7% menos risco de DCV ao longo da vida dos 45 aos 85 anos e as mulheres tiveram risco 11% menor (KUBOTA et al., 2017). Em relação ao câncer, a diretriz *American Society of Clinical Oncology (ASCO)* ressalta uma fragilidade em relação à qualidade de evidências no que diz respeito ao exercício físico e redução dos danos causados pela terapia anticâncer. Por outro lado, a diretriz mostra uma forte recomendação de exercícios aeróbios e resistidos com o intuito de reduzir alguns dos efeitos colaterais do tratamento, como a redução da qualidade de vida, ansiedade e depressão, além de preservar a aptidão cardiorrespiratória (LIGIBEL et al., 2022). O Guia de Recomendações de Atividade Física Durante e Após Tratamento Oncológico (CARVALHO GISAH, FABIO FORTUNATO GUILGEN et al., 2023), destaca que a prática de atividade física e exercício físico durante o tratamento oncológico é recomendada e com um alto nível de evidência, apresentando um baixo risco de eventos adversos durante sua prática, sendo que a recomendação é de 150 minutos semanais de atividades moderadas e/ou 75 minutos de atividades de intensidade vigorosa. Também foi evidenciado com um alto nível de evidência a redução da fadiga oncológica, melhora da qualidade de vida, estado

psicossocial e que a prática regular de exercícios pode evitar o comprometimento funcional. Em relação a redução da cardiotoxicidade e comprometimento cardiovascular por meio da prática de exercícios físicos a diretriz evidencia um baixo nível de evidência destacando assim a necessidade de estudos com esta temática.

Um estudo publicado por Fernandes et al. (FERNANDES et al., 2020) mostrou que o TFA atenuou a redução na fração de ejeção do ventrículo esquerdo (VE) e levou a um efeito benéfico no remodelamento cardíaco em camundongos com caquexia do câncer de colón. Por outro lado, pouco se sabe sobre o impacto do TFA na função e estrutura cardíaca em diferentes modelos de câncer (ANTUNES; FERREIRA; MOREIRA-GONÇALVES, 2018). Em nosso laboratório, temos demonstrado o importante efeito terapêutico do TFA nas alterações musculares esqueléticas e vasculares desencadeada pela HA e pelo câncer durante a progressão das doenças (FERNANDES et al., 2012; GOMES et al., 2021; JORDÃO et al., 2017; ROQUE et al., 2013). Estes conhecimentos advindos do TFA em diferentes doenças, como a HA e o câncer, colocam o exercício em uma posição estratégica tanto na prevenção quanto no tratamento de danos estruturais e funcionais cardíacos para doenças crônicas degenerativas. Portanto, aprofundar os conhecimentos sobre o papel do TFA neste contexto é de grande interesse e necessário, uma vez que efeitos do TFA sobre alterações cardíacas frente a associação da HA e do câncer são desconhecidos.

1.2 Justificativa

Considerando a prevalência crescente e a morbimortalidade, a HA e o câncer representam um grave problema de saúde pública (BARRETO et al., 2020; BOZKURT et al., 2016; INCA, 2019; MALACHIAS et al., 2016; SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2020).

A primeira ideia de uma relação entre a HA e o câncer de mama foi descrita em 1960, devido à similaridade dos mecanismos hormonais em ambas as condições (DE WAARD; DE LAIVE; BAANDERS-VANHALEWIJN, 1960). Posteriormente, diversos ensaios retrospectivos foram realizados relacionando o tratamento anti-hipertensivo (inibidores da enzima conversora de angiotensina, bloqueadores dos receptores da angiotensina II, β bloqueadores, bloqueadores dos canais de cálcio e diuréticos) e o

desenvolvimento de câncer de mama (ARMSTRONG; STEVENS; DOLL, 1974; BOSTON COLLABORATIVE DRUG SURVEILLANCE PROGRAM., 1974; HEINONEN et al., 1974). Contudo, as evidências até agora são inconclusivas e em particular para usuários de bloqueadores dos canais de cálcio, como demonstrado em uma recente meta-análise que incluiu 33 estudos com 260.447 participantes e 15.012 eventos de câncer (COPLAND et al., 2021). Além disso, várias terapias antineoplásicas foram relatadas como causadoras de HA (MOHAMMED et al., 2021).

Estudos têm mostrado que pacientes com câncer de mama têm um risco 1,7 a 1,8 vezes maior de mortalidade específica de DCV, um risco 1,2 a 1,3 vezes maior de incidência de DCV (por exemplo, doença arterial coronariana, doença cerebrovascular e insuficiência cardíaca), e um risco 1,3 a 3,1 vezes maior de fatores de risco de DCV (por exemplo, HA, diabetes e dislipidemia) (SCOTT et al., 2016).

Recentemente, um elegante estudo realizado com participantes em todo mundo investigou a prevalência e progressão da HA indicando que $\cong 700$ milhões de indivíduos no mundo não são tratados ou não recebem o tratamento adequado frente ao quadro de HA (NCD RISK FACTOR COLLABORATION (NCD-RISC), 2021), o que pode estimular o desenvolvimento/agravamento de DCV e câncer. Dessa forma, estudos que relacionem tanto a HA e o câncer, ambos sem a presença de tratamento para entender os mecanismos funcionais, morfológicos e moleculares bem como, os efeitos do TFA, não são possíveis no cenário clínico e todo este conhecimento se faz necessário frente a este contexto mundial de indivíduos não tratados de forma adequada e da evidência de agravamento das doenças, por essa relação bidirecional.

Diante dos fatos, o estudo se justifica devido à investigação com uso do TFA ser não somente fundamental na prevenção primária da HA e do câncer, bem como uma ferramenta para auxiliar na redução dos gastos públicos, também, como uma intervenção não farmacológica, diminuindo a incidência de diagnósticos relacionados à ambas as patologias e melhorando o prognóstico para os próximos eventos cardiovasculares e oncológicos.

Embora haja um crescente interesse a respeito da cardio-oncologia, nenhum estudo até o momento investigou a relação bidirecional da HA e câncer e a influência do TFA neste mesmo contexto. Dados prévios do nosso Laboratório corroboram com os da

literatura na tentativa de explicar os efeitos benéficos do TFA sobre alterações musculares esqueléticas e cardíacas induzidas tanto pela HA quanto pelo câncer (FERNANDES et al., 2015; GOMES et al., 2021; PEREIRA et al., 2020). Entretanto, entendemos que o próximo passo seria relacioná-lo de forma direta nas alterações cardíacas induzidas pela associação da HA e o câncer; haja visto que, embora de suma importância, não há nenhum estudo relacionando ambas as patologias. Além disso, é razoável supor que o conhecimento dos mecanismos moleculares induzidos pelo TFA, os quais podem oferecer benefícios para os sintomas e malefícios acarretados pela doença, poderão servir de base para o desenvolvimento de futuras estratégias terapêuticas no coração, aumentando assim a sobrevida e a melhora da qualidade de vida dos pacientes com HA e câncer.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Investigar a associação entre a HA e o câncer nas alterações fenotípicas cardíaca e no crescimento tumoral em ratos. Ainda, verificar o papel terapêutico do TFA sobre a cardiomiopatia e a incapacidade funcional induzida pela relação bidirecional entre as doenças.

2.2 Específicos

2.1.1 Avaliar o efeito associativo da HA em um modelo de Shr e do câncer em um modelo de Walker-256.

2.1.2 Avaliar o efeito terapêutico do TFA na associação da HA em Shr e do câncer em Walker-256.

Avaliaremos tanto para o objetivo 2.2.1 quanto para o 2.2.2 os parâmetros listados abaixo:

- o comportamento da pressão arterial e da frequência cardíaca de repouso;
- a capacidade de realização ao esforço físico máximo;

- a evolução da massa corporal, progressão tumoral e o percentual de caquexia;
- a capacidade oxidativa e morfológica muscular esquelética;
- a morfologia e função cardíaca;
- o diâmetro dos cardiomiócitos, a razão capilar:fibra e a fibrose cardíaca;
- a expressão dos miRNAs-208a, -208b e -499 cardíaco e circulante;
- a expressão gênica de marcadores de hipertrofia cardíaca patológica, inflamação e colágeno;
 - a expressão de proteínas cardíacas envolvidas com a sobrevivência e a apoptose celular.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Epidemiologia das doenças cardiovasculares e do câncer

Dados epidemiológicos publicados pela Associação Americana de Cardiologia mostram que as DCV são a principal causa de morte nos Estados Unidos da América (EUA), segundo o último levantamento publicado em janeiro de 2020 (ROTH et al., 2020). Em relação a prevalência total das DCV, elas quase dobraram de 271 milhões em 1990 para 523 milhões em 2019, e o número de mortes por DCV aumentou de 12,1 milhões em 1990 atingindo 18,6 milhões de indivíduos em 2019 (ROTH et al., 2020).

A HA é o principal fator de risco para as DCV como: doença arterial coronariana, acidente vascular cerebral e insuficiência cardíaca (IC) (MENSAH et al., 2023; TSAO et al., 2022; ZHOU et al., 2021). A HA está associada a 13,5% de todas as mortes anuais em todo o mundo, sendo assim, ela é considerada o principal fator de risco modificável para as doenças cardiovasculares. Neste sentido, o controle da pressão arterial se faz necessário para reduzir os números de eventos cardiovasculares e a mortalidade por todas as causas (MAGNUSSEN et al., 2023). No período de 2008 a 2017 foram estimadas 667.184 mortes atribuíveis à HA no Brasil. Vale ressaltar que o número de mortes diretamente relacionadas com a HA é pequeno, pois esta patologia mata mais devido a sua lesão nos órgãos alvos (BARROSO et al., 2021). A estimativa é de que 6,2 milhões de norte-americanos têm IC, que é a principal via final das DCV, incluindo a HA.

Projeções mostram que a prevalência de IC irá aumentar em torno de 46% entre 2012 a 2030 (VIRANI et al., 2020). De forma similar, segundo a Sociedade Brasileira de Cardiologia (2016), ocorreram 339.672 óbitos por DCV no Brasil, sendo a principal causa de morte e responsável por 29,8% do total de óbitos no país (MALACHIAS et al., 2016).

A Sociedade Americana do Câncer relatou que a estimativa para o ano de 2024 é de 2.001.140 novos casos e 611,720 mortes por câncer no país para ambos os sexos dos quais o maior número de mortes ocorrerá por câncer de pulmão, colorretal e pâncreas em homens e câncer de pulmão, mama e colorretal em mulheres (SIEGEL; GIAQUINTO; JEMAL, 2024). A estimativa de novos casos de câncer para o ano de 2021 em todo o mundo foi cerca de 19,3 milhões (18,1 milhões excluindo câncer de pele não melanoma), e quase 10,0 milhões de mortes por câncer (9,9 milhões excluindo câncer de pele não melanoma) ocorreram em 2020 (SUNG et al., 2021).

De modo similar, no Brasil, foram estimados para o ano de 2023, 704 mil novos casos de câncer, sendo os mais incidentes nos homens o câncer de próstata, cólon e reto e nas mulheres o câncer de mama é o principal, seguido pelo de cólon e reto (SANTOS et al., 2023). Dentre os diagnósticos, 66 mil casos são de câncer de mama; valor este correspondente a 29,7% do total apresentado (INCA, 2019). Ainda, segundo o Instituto Nacional de Câncer, a perspectiva para 2030 é de cerca de 21,4 milhões de novos casos em todo o mundo, sendo que desses cerca de 13,2 milhões ocasionarão a morte desses pacientes. O câncer de pulmão, próstata, colorretal e estômago são os tipos mais comuns de câncer em homens, enquanto câncer de mama, colorretal, pulmão e colo do útero são os mais comuns entre as mulheres (INCA, 2019; SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2020).

Em 2016, havia uma estimativa de 15,5 milhões de sobreviventes de câncer nos EUA, e essa população deve crescer para 26,1 milhões em 2040 com comorbidades cardiovasculares e fatores de risco (BLUETHMANN; MARIOTTO; ROWLAND, 2016). Visto o grande aumento na sobrevida destes pacientes e o desenvolvimento de problemas cardiovasculares relacionados tanto ao tratamento quanto a progressão de ambas as doenças, surgiu a cardio-oncologia e a HA mostra ser uma intersecção tanto para o câncer quanto para o agravamento de danos cardíacos (GUDSOORKAR et al., 2021; HERRMANN et al., 2014; STRONGMAN et al., 2022).

Além de todo o contexto epidemiológico, tanto a HA quanto o câncer geram grandes gastos com o processo de internação no Brasil. A HA no ano de 2018 gerou 17.323.224,38 reais de gasto com internações, já o câncer de mama gerou 139.028.192,79 reais de gastos no mesmo período (BARRETO et al., 2020). Nesse contexto, se faz importante tanto a pesquisa básica quanto a clínica para obter sucesso não apenas na sobrevida livre de câncer, mas também livre de danos cardiovasculares.

3.2 Caracterização da hipertensão arterial e do câncer

A HA e o câncer são doenças complexas e de causa multifatorial. Seu desenvolvimento é determinado por uma combinação de fatores ambientais associados à susceptibilidade genética (BARROSO et al., 2021; INCA, 2019). Ambas as doenças apresentam fatores de risco similares, tais como: obesidade, diabetes, ingestão excessiva de sódio e sedentarismo (HANDY et al., 2018; KIDOGUCHI et al., 2021) (Fig. 1).

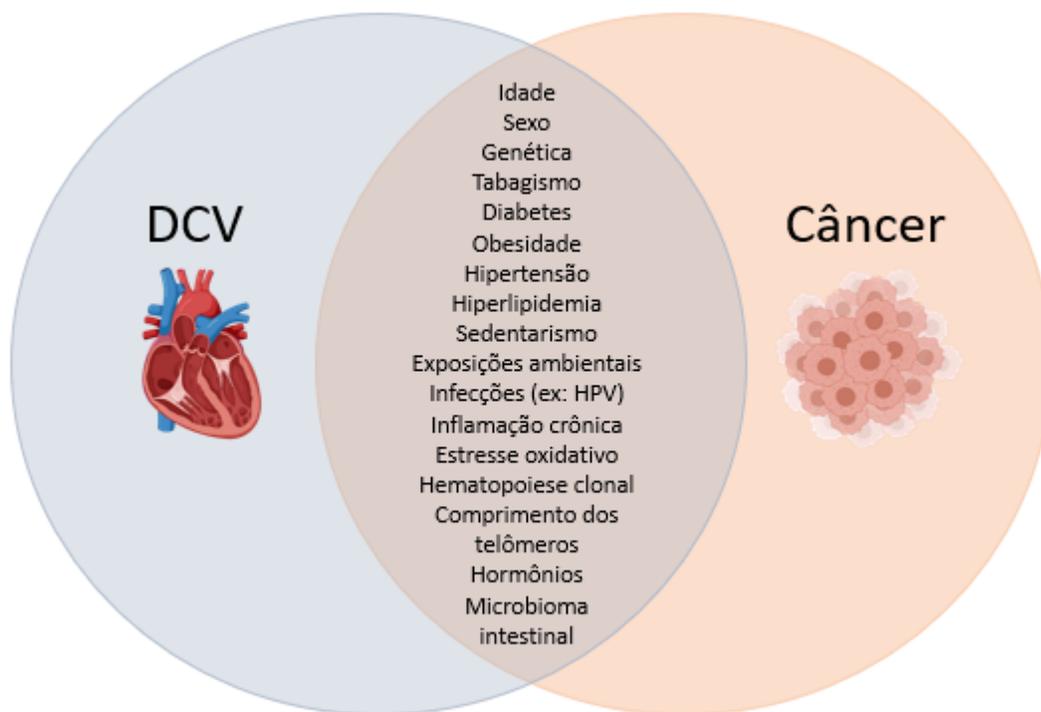


Figura 1. Fatores de risco comum das DCV e câncer. Adaptado de HANDY *et al.*, (2018).

Sabe-se que a HA é uma síndrome caracterizada por níveis elevados e sustentados de pressão arterial (PA) que permitem classificar como hipertensos indivíduos com pressão sistólica ≥ 140 mm Hg e/ou pressão diastólica ≥ 90 mmHg (BARROSO et al., 2021). A PA é o produto do débito cardíaco e da resistência periférica total. Em condições normais, a PA deve ser mantida em uma estreita faixa de variação, permitindo uma adequada perfusão tecidual. Este controle envolve grande número de substâncias e de sistemas fisiológicos que interagem de maneira complexa para manter a PA em níveis adequados, nas mais diversas situações fisiológicas. Dessa forma, o controle da PA envolve mecanismos neurais, humorais e renais que, em curtos e longos prazos, modulam não só a atividade do sistema nervoso autônomo para o coração e para os vasos, como também o volume sanguíneo e a secreção de vários hormônios (BI, 2005; IRIGOYEN et al., 2005). A HA essencial em adultos pode ser explicada por uma elevada resistência vascular periférica ao fluxo sanguíneo sem alterações no débito cardíaco (BI, 2005; IRIGOYEN et al., 2005; MULVANY, 2012). A microcirculação composta por arteríolas e capilares, primariamente localizadas na parte distal da vasculatura arterial, constitui o maior local de origem da resistência vascular e a fundamental causa de aumento desta resistência é devido à diminuição no diâmetro da luz do vaso bem como a perda dos mesmos, podendo ser acompanhada de uma disfunção endotelial (FEIHL et al., 2008; MULVANY, 2012).

É conhecido que a HA é a mais importante causa de desenvolvimento de IC com fração de ejeção preservada (ICFEp) com 60% a 80% dos casos (BOZKURT et al., 2016). Números maiores são encontrados no estudo de Framingham, em que uma coorte acompanhou 5.143 pacientes mostrando que 91% dos casos de IC eram de pacientes hipertensos (DAWBER; MEADORS; MOORE, 1951), chegando a um valor de risco duas vezes maior em homens e três vezes em mulheres de desenvolver IC.

Uma revisão publicada no *The Lancet* mostrou que aproximadamente 700 milhões de pessoas em todo o mundo possuem HA não tratada (NCD RISK FACTOR COLLABORATION (NCD-RISC), 2021). Neste sentido, entender os efeitos desta HA não tratada se faz necessário. Desde 1990 elevados níveis de pressão arterial sistólica, vem

sendo descritos por ser o principal fator de risco modificável para as DCV e esses dados se mantêm até os dias atuais (ROTH et al., 2020).

O câncer é um termo que se refere a um conjunto de mais de 200 doenças, que possuem em comum alterações no ciclo celular, levando ao crescimento e proliferação celular desordenada. Seu desenvolvimento é resultado de alterações genéticas traduzidas em aumento na expressão de oncogenes e a redução de genes supressores de tumor que favorecem o crescimento tumoral. Essas alterações podem ser herdadas devido a mutações em células germinativas ou adquiridas em consequência da exposição a agentes carcinogênicos ou agentes infecciosos por mutações em células somáticas. Entre eles, podemos citar, o hábito alimentar, a poluição, a radiação, os vírus e as bactérias, a exposição ao fumo, entre outros (INCA, 2019).

O processo de carcinogênese constitui-se em três fases. A primeira fase envolve o acúmulo de mutações genéticas de forma lenta e gradual conhecida por “iniciação”. Nesta fase, ainda não é possível detectar um tumor. No segundo estágio, conhecido por “promoção”, as células já alteradas geneticamente durante a primeira fase, sofrem os efeitos de oncopromotores que transformam as células iniciadas em células malignas. Para que ocorra essa transformação, o contato contínuo com o agente cancerígeno promotor é necessário, o que ocorre de maneira lenta e gradual. O terceiro estágio, conhecido por “progressão”, se caracteriza pela multiplicação descontrolada e irreversível das células alteradas. Nesta fase, a neoplasia já está instalada e evoluindo até que apareçam as primeiras manifestações clínicas da doença (INCA, 2019). Além disso, estas células podem invadir tecidos e órgãos adjacentes, levando a formação de tumores secundários em locais próximos ao primeiro foco tumoral ou formação de tumores distantes quando estas células cancerosas caem na circulação e migram para outros locais com determinada especificidade, dando origem a nova formação tumoral, denominada de metástase (INCA, 2019; WHO, 2018).

É conhecido que $\cong 80\%$ dos pacientes com câncer em estágio avançado da doença apresentam caquexia e mais de 25% das mortes induzida pelo câncer é consequência direta da caquexia (TISDALE, 2010). Ela é definida como uma síndrome multifatorial caracterizada pela perda de massa muscular esquelética (com ou sem a perda de massa gorda) que não pode ser revertida por suporte nutricional convencional

e que resulta na progressiva incapacidade funcional. A caquexia está diretamente relacionada a uma redução da tolerância ao esforço físico, falta de ar, fadiga, redução da tolerância aos tratamentos e uma menor sobrevida dos pacientes; que também são sinais clínicos de IC (BARKHUDARYAN et al., 2017; TISDALE, 2009, 2010). Curiosamente, estudos têm mostrado remodelamento e disfunção cardíaca em indivíduos que desenvolveram caquexia independentemente do tipo de câncer (ANKER et al., 2021). Mais pesquisas precisam descobrir novas opções de tratamento para prevenir os danos cardíacos, melhorar a qualidade de vida e aumentar a sobrevida de pacientes com caquexia do câncer (ANKER et al., 2021; ANTUNES; FERREIRA; MOREIRA-GONÇALVES, 2018; BARKHUDARYAN et al., 2017).

Tanto a HA quanto o câncer se destacam devido a sua alta prevalência na população e por compartilhar diversos fatores de risco em comum (KIDOGUCHI et al., 2021; SERETIS et al., 2019). Devido a toda esta associação, uma série de pesquisas com o termo onco-hipertensão foram publicadas recentemente (GUDSOORKAR et al., 2021; KIDOGUCHI et al., 2021; RUF et al., 2021), com o objetivo de entender se a HA tem relação com o desenvolvimento de câncer, como as terapias anticâncer afetam a PA dos pacientes e por fim, em relação ao manejo dos pacientes com ambas as doenças. Segundo a Diretriz Brasileira de Cardio-oncologia (2020), 35% dos pacientes com câncer irão desenvolver HA ao longo do tratamento (HAJJAR et al., 2020). Entretanto, com o aumento da sobrevida de pacientes com ambas as patologias, mais pesquisas são necessárias para entender a relação das doenças (RUF et al., 2021).

3.3 Remodelamento e função cardíaca na hipertensão arterial e no câncer

A doença cardíaca hipertensiva pode ser dividida em quatro categorias ascendentes, com base no impacto fisiopatológico e clínico da hipertensão no coração (MESSERLI; RIMOLDI; BANGALORE, 2017): Grau I: Disfunção diastólica isolada do ventrículo esquerdo (VE) sem hipertrofia do VE, Grau II: Disfunção diastólica do VE com hipertrofia concêntrica do VE, Grau III: IC clínica (dispneia e edema pulmonar com fração de ejeção preservada) e Grau IV: Cardiomiopatia dilatada com IC e fração de ejeção reduzida. As categorias indicam que a disfunção diastólica é uma complicação muito mais

comum da HA crônica do que a disfunção sistólica. Pacientes com ICfEp têm mais hipertrofia do VE, lesões epicárdicas da artéria coronária, rarefação microvascular coronariana e fibrose miocárdica do que os indivíduos controles (MESSERLI; RIMOLDI; BANGALORE, 2017). O diagnóstico de hipertrofia do VE na HA é um indicativo de pobre prognóstico. De fato, a mortalidade por causa cardiovascular de pacientes hipertensos com hipertrofia do VE é cerca de 70% superior ao de pessoas sem hipertrofia ventricular (CUSPIDI et al., 2012).

De forma similar ao desenvolvimento da HA em humano, os animais espontaneamente hipertensos (Shr) têm sido amplamente utilizados para estudar o remodelamento cardíaco e a hipertrofia do VE compensada a qual evolui progressivamente para a disfunção ventricular e a IC (DIWAN; DORN, 2007; DRAZNER, 2011). A hipertrofia cardíaca induzida pela HA é causada pela sobrecarga de pressão conhecida como hipertrofia concêntrica com um aumento desproporcional na espessura da parede (CAMPOS et al., 2015; DIWAN; DORN, 2007; DRAZNER, 2011; GARCIARENA et al., 2009). Depois de desenvolver HA e hipertrofia ventricular esquerda, os Shr permanecem compensados por um longo período até o aparecimento da disfunção ventricular (CAMPOS et al., 2015; GARCIARENA et al., 2009). Estudos mostram que a partir dos 16 meses de idade os Shr começam a apresentar características clínicas de IC, tais como congestão pulmonar e hipertrofia ventricular direita (DAMATTO et al., 2013; PAGAN et al., 2015). Sem tratamento, os ratos evoluem para a morte dentro de duas a quatro semanas.

Estudos têm mostrado que fatores de risco de DCV, como HA, diabetes, hiperlipidemia e obesidade, podem ser mais prevalentes em pacientes com câncer do que na população em geral, provavelmente porque há fatores de risco comuns para as duas patologias (Fig. 2). Ainda, estudos clínicos revelaram que o risco de câncer em pacientes com IC é 68% maior do que em pacientes sem IC (HASIN et al., 2013, 2016). Meijers et al. (MEIJERS et al., 2018) investigaram a relação causal entre IC e câncer e demonstraram um aumento significativo de 2,4 vezes no volume tumoral intestinal em camundongos com IC, e a gravidade da disfunção do VE e do conteúdo fibrótico foi fortemente correlacionada com o crescimento do tumor. Além disso, níveis elevados de serpina A3 no soro de pacientes com IC estava associado a uma maior proliferação em

células de câncer de cólon humano *in vitro*. Portanto, os efeitos recíprocos entre o coração e o câncer podem exacerbar as condições da doença e as citocinas ou vias compartilhadas que são responsáveis pelo *crossstalk*, embora mal definido, podem ser potenciais alvos terapêuticos.

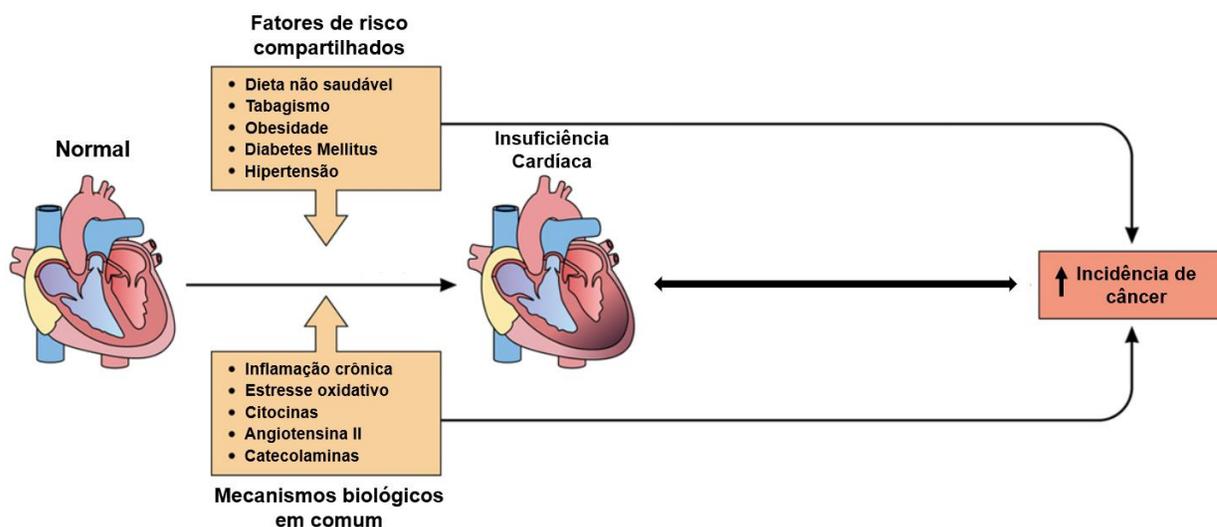


Figura 2. Mecanismos e fatores de risco associados a IC e câncer. Adaptado de KITSIS; RIQUELME; LAVANDERO., (2018).

É importante ressaltar que os fatores de risco são fortes preditores de DCV relacionada ao tratamento oncológico (antraciclina, radioterapia e imunoterapia), um fenômeno conhecido como toxicidade cardiovascular (SCOTT et al., 2016). Disfunção endotelial, síndrome coronariana aguda, arritmias ventriculares e disfunção cardíaca conduzindo ao quadro de IC, tem sido descrita durante ou após o tratamento quimioterápico (ANTUNES; FERREIRA; MOREIRA-GONÇALVES, 2018; BARKHUDARYAN et al., 2017; SCOTT et al., 2016).

Chapman et al. (CHAPMAN et al., 2008) investigaram as causas de morte em um estudo randomizado de imunoterapia adjuvante estendida entre 5.170 pacientes com câncer de mama em estágio inicial. Após 3,9 anos de acompanhamento, as mortes não relacionadas ao câncer de mama (principalmente DCV) foram responsáveis por 60% da mortalidade geral. Além disso, pacientes com fatores de risco de DCV preexistentes no início do estudo tinham 54% mais probabilidade de morrer de causas não relacionadas

ao câncer de mama. O desenvolvimento de fatores de risco de DCV após a terapia também aumentaram o risco de DCV. Hooning et al. (HOONING et al., 2007) examinaram as causas de mortalidade em longo prazo entre 7.425 mulheres tratadas para câncer de mama precoce e descobriram que, após um acompanhamento médio de 13,8 anos, pacientes com diagnóstico de um fator de risco de DCV em qualquer momento durante o acompanhamento do estudo teve um risco 1,4 a 3,1 vezes maior de mortalidade relacionada a DCV em relação a mulheres de mesma idade na população em geral.

Embora as observações de morte em pacientes com câncer relacionadas ao dano cardiovascular não sejam novas (ANTUNES; FERREIRA; MOREIRA-GONÇALVES, 2018; BARKHUDARYAN et al., 2017; SCOTT et al., 2016), estudos recentes focaram em como a caquexia é responsável ou contribui para a IC (TONETO et al., 2016). Assim, as alterações na estrutura e no metabolismo do músculo cardíaco que ocorrem durante a progressão da caquexia do câncer são mal compreendidas. É possível que a relação bidirecional das doenças possa potencializar os danos cardíacos com ambiente inflamatório, infiltração de células imunes, produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (KOELWYN et al., 2020).

Estudos emergentes fornecem sugestões sobre como a caquexia induzida pelo câncer pode causar danos ao coração. Tian et al. (TIAN et al., 2010, 2011) observaram que camundongos caquéticos apresentaram diminuição da função cardíaca contrátil e da frequência cardíaca, com aumento concomitante de fibrose, atrofia cardíaca, remodelamento e presença de citocinas pró-inflamatórias no tecido cardíaco. Outros estudos mostraram a contribuição da proteólise e do estresse oxidativo para o dano cardíaco induzido pela caquexia do câncer (SPRINGER et al., 2014). Borges et al. (BORGES et al., 2014) também observaram alterações cardíacas, como o tamanho e a espessura ventricular reduzidos em animais portadores de tumor de Walker-256. Corroborando, Toneto et al. (TONETO et al., 2016) mostraram IC induzida pelo modelo de caquexia do câncer. Este efeito foi evidenciado pelo aumento de biomarcadores de dano cardíaco, atividade do proteassoma elevada, alterações no eletrocardiograma e aumento de atividade pró-apoptótica em ratos portadores do tumor de Walker-256. Estudos relacionando o crescimento neoplásico e IC têm sido cada vez mais importantes para melhor compreensão do estado caquético e possíveis intervenções terapêuticas

(TONETO et al., 2016). Embora os dados obtidos em estudos com modelos animais sejam apenas pré-clínicos, eles vêm colaborando para o entendimento dos mecanismos envolvidos em diferentes doenças sistêmicas, como no caso da HA e do câncer. Além disso, os estudos com experimentação animal permitem isolar as variáveis e avaliar os efeitos deletérios específicos da HA e do tumor sobre o fenótipo cardíaco, enquanto ensaios clínicos, como evidenciados na literatura, não permitem distinguir qual dos estímulos está associada ao dano cardíaco (tumor, fatores de risco ou tratamento oncológico). Levando isso em consideração, sendo uma das razões para o presente estudo, investigaremos se o câncer, de forma isolada, leva a alterações sistêmicas que afetam o coração e se a associação com a HA pode agravar ainda mais o fenótipo cardíaco e a progressão tumoral, repercutindo em uma piora da capacidade funcional.

Embora grandes avanços tenham sido feitos no entendimento das DCV e cânceres, os mecanismos moleculares envolvidos nas anormalidades cardíacas permanecem pouco elucidados. Os miRNAs têm ganhado grande destaque por regularem pós-transcricionalmente a expressão de seus genes alvo (mRNAs) e vias de sinalização (AMBROS, 2004; BARTEL, 2004). Como um importante modulador da fisiologia e das DCVs, o miRNA-208a, um miRNA enriquecido cardíaco, também desempenha papéis importantes na modulação da biologia do câncer (CALLIS et al., 2009; LI et al., 2014; LIU et al., 2014). O miRNA-208a é um membro de uma família de miRNA que também inclui o miRNA-208b e é codificado por uma região intrônica do gene *Myh6* (α -miosina de cadeia pesada). No coração, miRNAs-208a e b estão envolvidos na regulação da isoforma de cadeia pesada da miosina durante o desenvolvimento e em condições fisiopatológicas (VAN ROOIJ et al., 2009). Com relação ao desenvolvimento cardiovascular e crescimento normal, o miRNA-208a funciona como um importante regulador de múltiplas redes de genes associadas à condução e contração cardíaca (BABIARZ et al., 2012; CALLIS et al., 2009). O miRNA-208a também modula vários processos fisiopatológicos cardiovasculares, incluindo remodelamento e disfunção cardíaca (MONTGOMERY et al., 2011). Recentemente, a identificação do miRNA-208a na corrente sanguínea gerou um grande interesse clínico em usar esta molécula como um potencial biomarcador não invasivo de lesões miocárdicas (NAVICKAS et al., 2016).

Com relação à cardio-oncologia reversa, estudos recentes mostraram que o miRNA-208a promove a proliferação e invasão de células cancerígenas (LI et al., 2014; LIU et al., 2014). O miRNA-208a pode ser secretado de cardiomiócitos lesados na forma de exossomos mediando o *crosstalk* célula-célula, em seguida, transportado para tumores, promovendo assim a proliferação e invasão tumoral. A progressão do tumor e a terapia anticâncer subsequente podem agravar ainda mais a lesão cardíaca, resultando na formação de um ciclo vicioso (WANG et al., 2021). Interessantemente, a inibição do miRNA-208a poderia melhorar a função cardíaca (MONTGOMERY et al., 2011; TONY; YU; QIUTANG, 2015) e inibir a proliferação e invasão tumoral (WANG et al., 2021). Dessa forma, esses achados fornecem *insights* sobre a compreensão dos papéis do miRNA-208a na cardio-oncologia reversa e apoiam o uso do miRNA-208a como uma abordagem terapêutica para otimizar a terapia do câncer enquanto preserva a função cardíaca e previne a carcinogênese em pacientes com IC.

3.4 Efeito do exercício físico na hipertensão arterial e no câncer

Cada vez mais a atividade física regular vem sendo destacada por reduzir o risco de doenças não transmissíveis e mortes prematuras (LEE et al., 2022a). De fato, exercícios regulares induzem uma ampla gama de adaptações fisiológicas diretas e indiretas que melhoram a saúde cardiovascular (SANCHIS-GOMAR et al., 2022).

O TFA pode ser utilizado como terapia não farmacológica, devido ao amplo corpo de evidências sobre sua segurança, melhora da tolerância ao esforço, aumento da sobrevida e qualidade de vida; além de reduzir a hospitalização dos acometidos por doenças crônicas (LEE et al., 2022a; SANCHIS-GOMAR et al., 2022; TISDALE, 2009). A capacidade aeróbia vem sendo utilizada como um grande indicador de morte precoce tanto para indivíduos saudáveis quanto para aqueles com doenças associadas (BARKHUDARYAN et al., 2017). Além disso, ratos artificialmente selecionados para exibir alta capacidade aeróbia intrínseca apresentam maior expectativa de vida (~45%) quando comparados com ratos com baixa capacidade aeróbia (ANTUNES; FERREIRA; MOREIRA-GONÇALVES, 2018). De fato, a prática de atividade aeróbia está associada

à prevenção de um amplo espectro de distúrbios e doenças ao longo da vida, como o câncer, as DCV e as metabólicas (BARKHUDARYAN et al., 2017).

No coração, o TFA induz um aumento da sobrecarga de volume acompanhado de dilatação das câmaras cardíacas referido como hipertrofia excêntrica e aumento proporcional na espessura da parede (FERNANDES et al., 2015; PELOZIN et al., 2022). Assim, o TFA promove hipertrofia ventricular esquerda fisiológica, juntamente com as respostas adaptativas benéficas ao sistema cardiovascular como a bradicardia de repouso, aumento do VO₂ máximo e melhora da função cardíaca (BARKHUDARYAN et al., 2017).

Evidências crescentes sugerem que miRNAs circulantes e cardíacos são regulados dinamicamente pelo exercício em modelos animais e humanos (FERNANDES et al., 2015; RAMOS et al., 2018). Nosso grupo foi o primeiro a identificar miRNAs diferencialmente expressos com base na análise de um perfil de miRNAs em hipertrofia cardíaca induzida por TFA (DA SILVA et al., 2012; FERNANDES et al., 2011; SOCI et al., 2011). Ainda, relatamos que os níveis de miRNA-208a e -208b cardíaco foram reduzidos pelo TFA e contribuem sinergicamente para a hipertrofia cardíaca fisiológica, melhorando as respostas metabólicas e contráteis cardíacas com maior razão α -MHC / β -MHC, contornando o aumento do PPAR β e da regulação da histona desacetilase (HDAC) classes I e II (SOCI et al., 2016a). Estes resultados sugerem que o miRNA-208a pode ser um alvo terapêutico promissor para as DCVs e o câncer induzido pelo TFA.

Estudos têm mostrado que o TFA melhora a função endotelial e a perfusão coronariana, diminui a resistência periférica e induz o remodelamento das células musculares, levando ao aumento da captação de oxigênio, oxidação do substrato e resistência à fadiga na HA (GARCIARENA et al., 2009; LI; LI; GAO, 2020; ROMERO; MINSON; HALLIWILL, 2017). Estudo prévio do nosso grupo mostrou que o TFA atenuou a hipertrofia cardíaca patológica acompanhada de melhora da função ventricular e diminuição da PA em SHR. Estas alterações foram acompanhadas por uma redução do estresse oxidativo e da atividade do proteossoma sem afetar chaperonas e vias de apoptose (CAMPOS et al., 2015). No conjunto, os dados apoiam um efeito benéfico do TFA na HA, o que confirma o exercício como um hábito saudável que induz melhorias cardíacas.

No câncer, o TFA mostrou melhorar a capacidade cardiorrespiratória, a cardiotoxicidade, promover efeito hipotensor, melhorar a qualidade de vida, reduzir a fadiga oncológica, controlar a progressão tumoral e reduzir o potencial metastático (ASSI; DUFRESNE; RÉBILLARD, 2020; DA COSTA et al., 2021; GEBRUERS et al., 2019; GOMES-SANTOS et al., 2021; VENTURINI et al., 2020) (Fig. 3). Levando em consideração as diferentes estratégias de treinamento, tanto aeróbio, resistido ou a combinação de ambos, mostraram promover a diminuição dos marcadores pró-inflamatórios em pacientes com câncer (KHOSRAVI et al., 2019). Curiosamente, foi visto que a cada incremento de 1 MET na aptidão cardiorrespiratória é capaz de diminuir o risco de mortalidade em 26% por todas as causas de morte, 14% por causa cardiovascular e 25% por causa do câncer (GROARKE et al., 2020). Dessa forma, os estudos sustentam o fato de que o exercício aeróbio em intensidade moderada realizado por 150 min/sem ou o exercício vigoroso por 75 min/sem é uma conduta preventiva e terapêutica adjuvante no tratamento do câncer (STOUT et al., 2017).

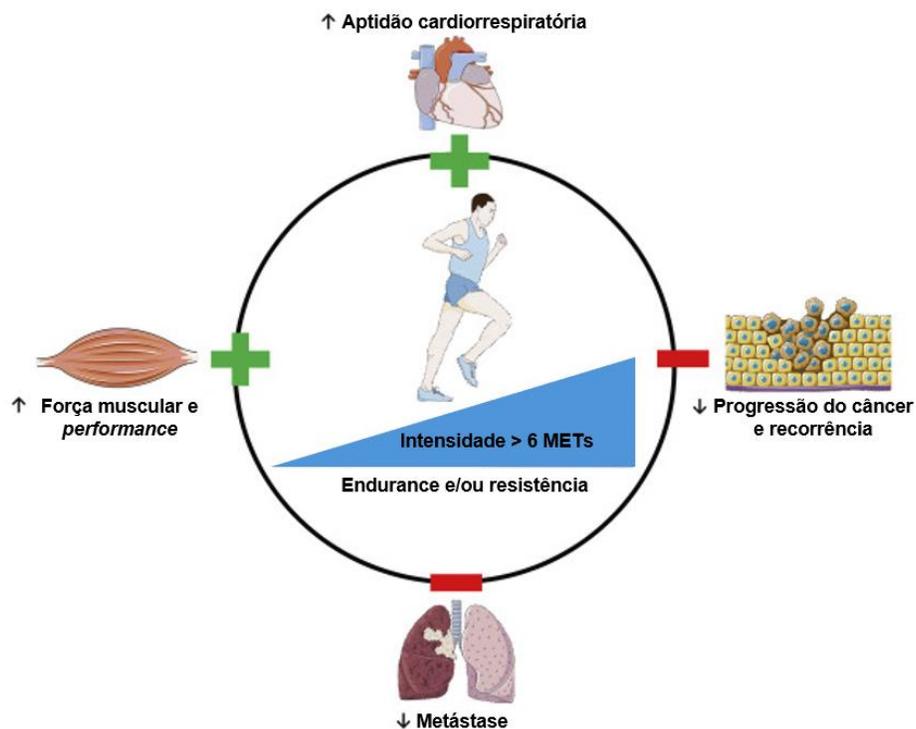


Figura 3. Benefícios do exercício na progressão e recorrência do câncer. Adaptado de ASSI; DUFRESNE; RÉBILLARD., (2020).

Similares efeitos do TFA foram descritos em animais com tumor Walker-256, com benefícios como: maior resistência ao crescimento do tumor, resistência no desenvolvimento de caquexia, prevenção da redução do peso corporal, melhora da sensibilidade à insulina e melhor desempenho físico (MOREIRA et al., 2019). Ainda, foi visto que a continuação do TFA após a inoculação do tumor aumentou a sobrevivência dos animais em 89% quando comparados com os animais sedentários com tumor. O TFA também promoveu uma mudança no metabolismo energético com redução do metabolismo glicolítico em detrimento ou aumento da atividade do metabolismo oxidativo, que foi acompanhado por uma redução do crescimento tumoral (BACURAU et al., 2007).

Estudo recente publicado por Fernandes et al. (FERNANDES et al., 2020) mostraram que o TFA atenuou a redução na fração de ejeção do VE e levou a um efeito benéfico no remodelamento cardíaco associado à redução da necrose, inflamação e deposição de colágeno em camundongos com caquexia do câncer de colón. Por outro lado, pouco se sabe sobre o impacto do TFA na função e estrutura cardíaca em diferentes modelos de câncer (ANTUNES; FERREIRA; MOREIRA-GONÇALVES, 2018). De fato, nenhum estudo até o presente momento foi realizado avaliando o efeito do TFA sobre as repercussões cardíacas no modelo de caquexia de Walker-256.

Estes conhecimentos advindos do TFA em diferentes doenças, tais como a HA e o câncer, colocam o exercício em uma posição estratégica tanto na prevenção quanto no tratamento de danos estruturais e funcionais cardíacos para doenças crônicas degenerativas. Portanto, aprofundar os conhecimentos sobre o papel do TFA neste contexto é de grande interesse e necessário, uma vez que efeitos do TFA sobre alterações cardíacas frente ao modelo de câncer de Walker-256 e em associação a HA são desconhecidos. Neste estudo, uma das propostas é verificar se o TFA previne as alterações no fenótipo cardíaco induzidas pelo câncer de Walker-256. Avaliar se a associação entre a HA e o câncer de Walker-256 pode agravar ainda mais o fenótipo cardíaco e a progressão tumoral, repercutindo em uma piora da capacidade funcional. Ainda, se o TFA atenuaria o remodelamento cardíaco patológico, a disfunção ventricular e a progressão tumoral induzida por esta associação entre HA e câncer.

4. MÉTODOS

4.1 Comissão de ética no uso de animais

Esse trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo com o número 2021/01. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

4.2 Animais

Foram utilizados 50 ratos machos espontaneamente hipertensos (Shr) e 50 ratos machos Wistar Kyoto (Wky), como controles dos ratos espontaneamente hipertensos (Shr). Para padronização das células tumorais e protocolo de treinamento físico, foram utilizados 24 ratos Wistar com 21 dias de idade. Os animais foram provenientes do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP). Os animais utilizados neste estudo foram mantidos em gaiolas plásticas em grupos de 3 ou 4 animais por caixa e separados por grupo experimental. A temperatura ambiente do biotério foi mantida entre 22^o- 24^oC com luz controlada em ciclo invertido de claro-escuro de 12 em 12 horas. Água e comida foram administradas *ad libitum*.

4.3 Implante tumoral

O implante do carcinoma de Walker-256 (linhagem proveniente do Banco de Tumores *Christ Hospital Line, Arthur D'Little*, EUA) foi efetuado no tecido subcutâneo da região do flanco direito, inoculando-se 2,5x10⁶ células viáveis por inóculo provenientes de animais doadores, conforme método descrito e padronizado previamente (TONETO et al., 2016). Os animais dos grupos controle (não implantados com tumor) receberam inoculação de 0,5 mL de solução fisiológica (0,9% de NaCl) no tecido subcutâneo do flanco direito, perfazendo o grupo sham.

4.4 Desenho experimental

Para realização da 1ª etapa do estudo, os animais foram aleatoriamente divididos em 4 grupos experimentais (n=12/ grupo) com 12 semanas de idade: Wky controle (WkyC); Wky tumor (WkyT); Shr controle; (ShrC); Shr tumor (ShrT). O inóculo ocorreu na 12ª semana de vida, correspondendo ao dia 0 do desenho experimental, e após $\cong 21$ dias de crescimento tumoral ou período pré-agônico (o qual corresponde em média 21 dias após o implante), os animais foram submetidos à avaliação hemodinâmica, cardíaca, de crescimento do volume tumoral e de capacidade funcional. Em seguida, realizamos a eutanásia e as avaliações histológicas e moleculares (Figura 4.A).

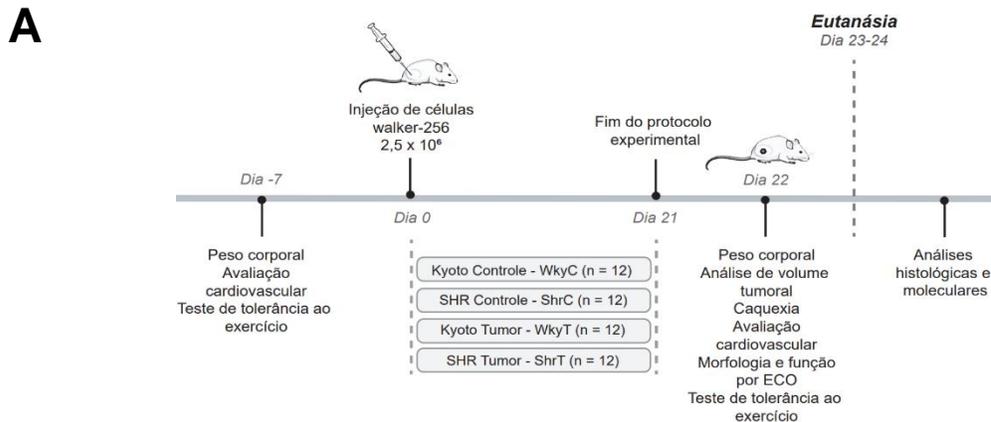


Figura 4.A: Desenho experimental na primeira etapa do estudo.

Para realização da 2ª etapa do estudo, avaliamos o papel do TFA sobre a associação entre a HA e o câncer. Os animais foram distribuídos em 04 grupos experimentais com carcinoma de Walker-256, de acordo com a presença ou não da HA e submetidos ou não ao TFA, a saber: Wky tumor (WkyT), WkyT exercício (WkyT-Ex), Shr tumor (ShrT) ShrT e exercício (ShrT-Ex). Os animais foram treinados durante 6 semanas, sendo 3 pré- e 3 pós-inóculo. O inóculo foi realizado de forma similar ao apresentado na primeira etapa, assim como as análises no período pós-experimental (Figura 4.B). Os ratos foram inicialmente identificados por números, pesados e adaptados ao protocolo de medidas hemodinâmicas e testes funcionais.

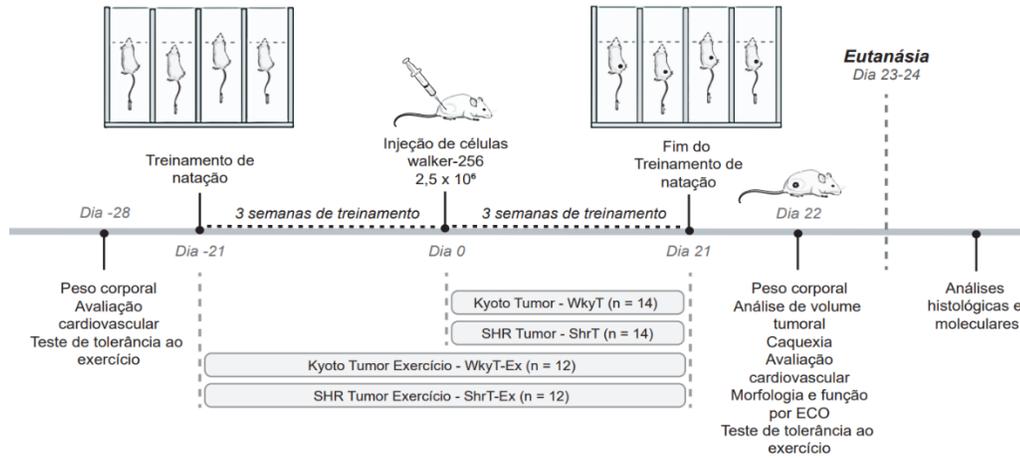
B

Figura 4.B: Desenho experimental na segunda etapa do estudo.

4.5 Protocolo de treinamento físico aeróbio

O TFA de natação foi realizado segundo protocolo de Medeiros et al. (MEDEIROS et al., 2004). Os animais foram treinados durante 6 semanas, sessões de 60 min, 1 vez ao dia, 5 vezes por semana, com aumento gradual da sobrecarga de trabalho (peso na cauda em porcentagem do peso corporal até atingir 5% do peso corporal). O protocolo utilizado foi caracterizado como treinamento de moderada intensidade e longa duração, sendo efetivo na promoção de adaptações cardiovasculares e no aumento da capacidade oxidativa muscular. Os ratos foram identificados e pesados semanalmente para a correção da sobrecarga de treinamento em função do aumento do peso corporal. O treinamento foi realizado em um sistema de natação específico para ratos, com água aquecida a 32° C (Figura 5).



Figura 5: Aparato de treinamento físico de natação para ratos.

4.6 Avaliação da pressão arterial e da frequência cardíaca de repouso

A PA foi acompanhada pré e pós-período experimental por pletismografia de cauda (sistema da KENT SCIENTIFIC RTBP1001 *rat tail blood pressure system for rats and mices*, Litchfield, USA) em todos os grupos experimentais. Os animais estavam acordados, em repouso, e foram mantidos sob restrição de movimentos para que as medidas fossem realizadas. O equipamento de registro da PA de cauda consiste em um manguito de borracha que é adaptado à região proximal da cauda, que está ligado ao pletismógrafo para insuflar e desinsuflar gradualmente o manguito de 1 a 250/300 mmHg. Na região mais distal da cauda é acoplado um transdutor de pulso pneumático para detecção dos sinais de passagem da onda de pulso de PA na artéria caudal e registrado no sistema de aquisição de sinais (MP100 WSW, Biopac Systems, Santa Bárbara, CA, USA) com uma frequência de amostragem de 1000 Hz. Este método de medida indireta permite quantificar a PA e a frequência cardíaca ao longo de todo o período experimental.

4.7 Avaliação de força e tolerância ao esforço físico máximo

Os animais foram posicionados individualmente sobre a esteira rolante. Imediatamente após o posicionamento do animal foi iniciado o teste de esforço. A

velocidade inicial foi de 6m/min (sem inclinação), que constitui em um protocolo escalonado com incrementos de velocidade de 3m/min a cada 3 min, até que seja atingida a velocidade máxima suportada pelos animais. O critério para a determinação da exaustão e interrupção do teste foi o momento em que o rato não foi mais capaz de correr dentro da caixa mediante o incremento de velocidade da esteira. Foram comparados o tempo (min), a velocidade (m/min) e a distância (m) percorrida por cada rato. O teste neuromuscular foi aplicado para medir a força de preensão do animal imposta através de uma grade. O Grip Strength Meter (Bonther®) que foi usado para este teste possui uma barra metálica transversa na qual o animal foi posicionado com as quatro patas em apoio. Em seguida, o animal foi retirado desta placa pelo avaliador pela cauda, gerando assim uma força de preensão nesta grade que foi interpretada pelo aparelho e gravada como a força exercida pelo animal. Foram realizadas 3 tentativas e a média foi utilizada como resultado.

4.8 Avaliação da função e estrutura ventricular- ecocardiograma

Com a finalidade de avaliar a função e a estrutura do VE, de forma não invasiva, foi realizado o exame ecocardiográfico transtorácico. Esta análise foi realizada em todos os grupos experimentais ao final do protocolo experimental com intuito de averiguar se animais com patologia e/ou treinados com diferentes condições alteram a função e a morfologia cardíaca. As medidas ecocardiográficas seguiram as recomendações da Sociedade Americana de Ecocardiografia. O exame ecocardiográfico foi realizado com os animais anestesiados com Isoflurano (dose de 3-5% por via inalatória). O animal anestesiado foi colocado em decúbito dorsal em uma mesa cirúrgica apropriada. Foi utilizado o equipamento Vivid 9 (GE Healthcare) com transdutor de 4 a 12 MHz, que permite imagens com 2 ou 3 cm de profundidade. As imagens foram armazenadas em *pen drive*, para análise posterior. As dimensões e massa do VE foram adquiridas pelo modo-M. A frequência cardíaca sob anestesia foi mantida em valores similares nos animais de ambos os grupos Wky e Shr para que alterações na mesma não interfiram na contratilidade miocárdica *per se* (efeito escada ou Bowditch). Foram realizadas as medidas de massa do ventrículo esquerdo corrigida, diâmetro diastólico do ventrículo

esquerdo (DDVE), diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo (DSVE), espessura do septo, da parede posterior (PP) e espessura relativa da parede (ERP), fração de ejeção (FE), fração de encurtamento (FS), volume sistólico final (VSF), volume diastólico final (VDF), desaceleração da onda E (MV Decel), razão E/A (MV E/A), tempo de contração isovolumétrico (IVCT), tempo de relaxamento isovolumétrico (IVRT) e índice de performance miocárdica (TEI).

4.9 Crescimento tumoral

A avaliação do crescimento tumoral foi realizada com o intervalo de um dia após a injeção das células tumorais utilizando um paquímetro. Foram mensurados o maior e o menor diâmetro do tumor de acordo com o descrito por Bergers et al.(BERGERS et al., 2003). Os valores obtidos foram utilizados na fórmula a seguir para a estimativa do volume tumoral: $V = 0,52 \times (\text{maior diâmetro}) \times (\text{menor diâmetro})^2$.

4.10 Indicadores de *endpoint* no manejo animal para controle dos níveis de dor e sofrimento

Os animais eram monitorados diariamente para que qualquer presença de dor ou sofrimento fosse evitado. Dessa forma, foram utilizados animais adultos jovens em que não configura nenhuma presença de dor e sofrimento no modelo animal de HA. Para os modelos com câncer, o tempo de 21 dias utilizado para o desenvolvimento de tumor configura um período pré-agônico. Para controle dos níveis de dor foram respeitados os sintomas de dores e desconfortos dos animais por meio da utilização do *Rat Grimace Scale*; por sua eficaz aplicabilidade como demonstrada em estudos e descrita por ser uma ferramenta de avaliação rápida da dor aguda em ratos. Sua avaliação é feita em uma escala de 0 (sem presença de dor), 1 (dor moderada) ou 2 (dor severa) e os sinais que analisamos foram: estreitamento orbital, achatamento de nariz / bochecha, mudanças na orelha (posição, orientação, forma) e mudança de bigode. Uma vez constatado estes sinais realizamos uma quantificação dentro dos valores indicados na escala e a partir destes dados realizamos uma média destes valores. Serão eutanasiados

os animais que atingirem o score 2, como descrito pelo manual (FOLTZ; ULLMAN-CULLERE, 1999; LEUNG; ZHANG; PANG, 2016; WALLACE, 2000).

Ainda, como ponto limite, o tamanho do tumor não poderia exceder 40 mm (4,0 cm) no maior diâmetro ou 15% do peso corporal do animal. Não foi realizado o uso de analgésicos para que nenhum dado, tanto pressórico, inflamatório ou de progressão tumoral, seja mascarado ou alterado. Com isso, após diagnóstico acima do limiar de dor permitido e do tamanho tumoral, os animais foram eutanasiados e retirados do estudo por estarem em sofrimento. Foram seguidas as diretrizes gerais do Comitê Coordenador de Pesquisa do Câncer do Reino Unido (UKCCCR, 1998) para o bem-estar animal (WORKMAN et al., 2010).

4.11 Coleta das amostras

Finalizado o prazo dos protocolos experimentais, os animais foram sacrificados por decapitação com anestesia inalatória prévia por isoflurano (dose de 3-5% por via inalatória) e o coração, sóleo, plantar, gastrocnêmio, pulmão, fígado, baço, gordura retroperitoneal e epididimal foram coletados, assim como o tumor sólido e imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenado a -80°C para serem utilizados nas análises de histologia, bioquímica e biologia molecular. Foram anotados peso corporal e comprimento da tibia para correção das medidas morfológicas adotadas.

4.12 Avaliação da massa cardíaca e muscular esquelética

Para avaliação da hipertrofia cardíaca foi feito um cálculo de razão, tanto entre o peso úmido do ventrículo esquerdo e a massa corporal total do animal (mg/g), quanto entre o peso úmido do ventrículo esquerdo e o comprimento da tibia (mg/mm). Procedimento similar foi realizado para os músculos esqueléticos coletados.

Para análise de caquexia, após 21 dias, cada massa tumoral foi retirada e pesada e o peso total da carcaça (peso corporal total menos o peso do tumor) foi medido.

4.13 Avaliação da atividade da enzima citrato sintase

Para avaliar a atividade da citrato sintase no músculo sóleo foi homogeneizado a 4°C em tampão de extração (pH 7,4) contendo Tris-base (50 mM) e EDTA (1 mM). As amostras foram centrifugadas a 3.000 g durante 15 minutos a 4°C e o sobrenadante foi utilizado para a realização da cinética enzimática. A quantificação da proteína no homogenato foi realizada segundo o método de Bradford. A atividade máxima da enzima foi determinada segundo Alp & Newsholme (ALP; NEWSHOLME; ZAMMIT, 1976) a partir de quantificação do complexo formado entre a coenzima A com o ácido 5,5'-ditio-bis 2 nitrobenzóico (DTNB), adicionado ao meio, formando um complexo amarelo. O tampão de ensaio foi constituído de Tris-base (100 mM), DTNB (0,4 mM), acetil-CoA (1,24 mM), Triton X-100 1% (v/v) e o homogeneizado. A reação foi iniciada pela adição de oxaloacetato (18,9 mM) ao meio e o registro da cinética enzimática será realizada a 25°C durante um intervalo de 10 minutos, em 412 nm com o uso do Victor (Victor3 1420 Multilabel Counter/ PerkinElmer, MA, USA). O resultado da atividade da enzima foi expresso em valores de $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg prote\acute{a}na}^{-1}$.

4.14 Avaliação da área de secção transversa dos cardiomiócitos pelo método imunohistoquímica

A hipertrofia cardíaca também foi avaliada pela análise da área de secção transversa dos cardiomiócitos. O VE foi cuidadosamente fixado em *tissue tek*, congelado e posteriormente cortado transversalmente no aparelho criostato (Leica CM1850, Leica Mycrossystems, Germany) na espessura de 10 μm . Os cortes foram corados com os anticorpos WGA (1:200; no. W32464; Invitrogen). A imagem foi ampliada 200x em objetiva de 20x e os cardiomiócitos com membrana celular intacta foram escolhidos para análise. A análise foi realizada por microscópio fluorescente associado a um sistema de análise de imagens Quantimet Leica®, (Leica, UK) por estudo-cego. Cinco campos visuais foram analisados por animal. Os resultados foram expressos em micrômetro quadrado (μm^2).

4.15 Avaliação da fibrose cardíaca pelo método histológico

A quantificação da fração de volume do colágeno intersticial cardíaco foi realizada pela coloração com Picrossirius-red e determinada por luz direta (40x). As análises foram realizadas em um sistema morfométrico associado a um computador (Leica Quantimet 500, Cambridge, UK). A fração de volume de colágeno foi calculada como a soma de todas as áreas de tecido de colágeno dividida pela soma de todas as áreas do músculo cardíaco em todos os campos. Os resultados foram expressos em porcentagem (%) do volume de colágeno.

4.16 Expressão de genes e miRNAs

4.16.1 Extração de RNA total cardíaco e circulante

Foi homogeneizado 50 mg de VE em 1 ml de Trizol (Invitrogen) e a extração foi realizada conforme instruções do fabricante. O RNA precipitado foi lavado com etanol 70% para eliminar resíduos de fenol e sal, e solubilizado em água tratada com DEPC. Para extração do RNA circulante, o mesmo foi isolado da fração exossomal do plasma por meio do kit exoRNeasy Serum/Plasma (Qiagen), de acordo com as recomendações do fabricante. A concentração das amostras de RNA total foi quantificada usando o espectrofotômetro NanoDrop (NanoDrop Technologies, USA).

A integridade foi verificada por meio de eletroforese em gel de agarose 1%, contendo 0.5µg/mL de brometo de etídeo. O gel foi imerso em tampão TAE 1X e a eletroforese realizada a 100 Volts por aproximadamente 40 minutos. A qualidade das amostras foi avaliada pela análise da intensidade das bandas correspondentes às subunidades do RNA ribossomal 28S e 18S, onde a relação 28S/18S deverá ser aproximadamente dois. Amostras que apresentaram algum grau de degradação foram descartadas.

4.16.2 Síntese de cDNA para expressão de genes e miRNAs

Para síntese de cDNA para expressão gênica foram utilizados 2 µg de RNA total, extraídos a partir do VE de ratos. As amostras foram incubadas com 0,5 µg/mL de oligo dT12-18 a 65°C por 5 min, para obtenção da primeira fita de cDNA. A transcrição reversa das amostras foi realizada em volume total de 20 µL contendo 3U de RNAsin (Promega, Madison, USA), 10 mM de dNTPs, 0,1 M de DTT, 1X tampão de enzima, e 2.5U de SuperScript Reverse Transcriptase II (Invitrogen, Brasil). Após incubação por 1 hora a 42°C, a temperatura foi elevada a 95°C por 5 minutos e as amostras foram rapidamente colocadas em gelo para desnaturação de híbridos RNA-cDNA formados.

O cDNA para análise de miRNAs foi sintetizado a partir do RNA total utilizando primers específicos para cada miRNA analisado de acordo com o protocolo TaqMan microRNA Assay (Applied Biosystems, CA, USA). Foram utilizados 1-10 ng de RNA em 1 µl. Foi preparada uma RT master mix com dNTPs 100mM, *multiscribe reverse transcriptase* 50U/ml, tampão 10x para a enzima, inibidores de RNase 20U/ml, totalizando 7µl. Foram adicionados 3 µl de primer e água livre de nuclease para completar o volume de 15µl de reação. A reação de PCR foi realizada a 16°C por 30 min, 42°C por 30 min, 85°C por 5 min e após as amostras foram mantidas a 4°C.

4.16.3 Reação de polimerase em cadeia em tempo real (RT-PCR) para expressão de genes e miRNAs

O RT-PCR para análise da expressão gênica das proteínas sarcoméricas cardíacas (α -MHC e β -MHC) e inflamação foram feitos pelo sistema de detecção do produto específico amplificado no equipamento 7500 Real Time PCR System (Applied-Biosystems) na presença do composto fluorescente SYBR-Green PCR Master Mix. A otimização da reação do RT-PCR foi feita conforme as instruções do fabricante, corrigido para volume final de 20 µL por reação. As condições de PCR foram padrão (protocolo do kit SYBR-Green master mix) e todos os reagentes foram fornecidos pelo kit, inclusive a enzima polimerase AmpliTaq-Gold (Applied-Biosystems). Depois da otimização, os *primers* foram utilizados na concentração de 200 nM para detecção e quantificação relativa da expressão do gene da 18S (gene controle-interno). O gene da 18S é considerado de ampla expansão, e foi utilizado como gene normalizador para os demais

genes. Os primers específicos de cada gene foram desenhados de acordo com as sequências disponíveis no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) utilizando a ferramenta Primer-BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast). Para os marcadores de hipertrofia patológica foram usados os seguintes primers: α -MHC: Foward CGAGTCCCAGGTCAACAAG e Reverse AGGCTCTTTCTGCTGGACC; β -MHC: Foward CATCCCCAATGAGACGAAG e Reverse AGGCTCTTTCTGCTGGACA; Para marcadores de inflamação utilizamos os primers: IL-6: Foward AGACTTCCAGCCAGTTGCCT e Reverse CTGACAGTGCATCATCGCTG; TNF α : Foward AGGACACCATGAGCACGGAA e Reverse GGGCCATGGAAGTATGAGA; como marcador anti-inflamatório, utilizamos IL-10: Foward AGAAGAGGGAGGAGCCTTTG e Reverse GCCTTTGCTGGTCTTCACTC.

O RT-PCR para análise da expressão dos miRNAs-208a, -208b e -499 cardíaco e circulante foram realizados no mesmo equipamento descrito acima. Para 20 μ l da reação de PCR foram incluídos 1,33 μ l do produto RT, 10 μ l de TaqMan 2X Universal PCR master mix II (No AmpErase UNG), 1 μ l de primer (TaqMan microRNA Assay 20X) e 7,67 μ l de água livre de nucleases. As reações foram incubadas a 95°C por 10 min, seguidos por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 min. Foi utilizado o U6 snRNA como normalizador para análise de cada miRNA testado. Os resultados foram expressos utilizando o método de limiar comparativo de ciclos ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) e expressos em porcentagem do controle.

4.17 Análise da expressão de proteínas

Foi analisada a expressão protéica dos alvos envolvidos na via de síntese, degradação, sobrevivência e apoptose celular. Amostras de VE foram homogeneizadas em tampão de extração RIPA contendo um coquetel de inibidores de proteases e fosfatases. As amostras foram mantidas no gelo e rapidamente centrifugadas (3.000 rpm X 10 min). O sobrenadante foi utilizado para quantificar a concentração total de proteínas pelo método de Bradford. Em seguida, cada amostra foi diluída em tampão Laemmli na proporção de 1:4, submetida a uma rotação (spin) de 30 segundos, e o sobrenadante submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 8 a 15%) no aparelho para

minigel (Mini-Protean). Em cada gel foi aplicado como padrão um marcador de peso molecular com valores estabelecidos em: miosina (205-195 kDa), galactosidase (116 kDa), albumina bovina (80 kDa) e ovalbumina (49,5 kDa).

A transferência das proteínas separadas no gel foi feita eletricamente para uma membrana de nitrocelulose utilizando-se um aparelho da Bio-Rad com duração média de 1h sob 120 volts. No tampão usado para realizar a transferência foi acrescentado SDS 0,1% para melhorar a eluição das proteínas de alto peso molecular. A ligação inespecífica de proteínas na membrana de nitrocelulose foi diminuída pela incubação destas com 10 ml de solução bloqueadora (leite desnatado Molico 5%, Tris 10 mM, NaCl 150 mM e Tween 20 0,02%) a 4°C overnight ou por 2h na temperatura ambiente. Estas membranas foram posteriormente incubadas com os anticorpos específicos para as proteínas alvos selecionadas no estudo como a via de síntese e sobrevivência (PI3K, Akt, p70, 4EBP1, Bcl-2, Bcl-x e GATA4) e a via de apoptose celular (Bad, Bax e FoxO1) em solução bloqueadora (leite desnatado Molico 3%, Tris 10 mM, NaCl 150 mM e Tween 20 0,02%) e a 4°C overnight. A proteína GAPDH foi utilizada como normalizador para as demais proteínas. Em seguida, as mesmas foram lavadas 3x10 min com solução basal, incubadas por 2 horas com os respectivos anticorpos secundários conjugados à peroxidase. Posteriormente o complexo foi detectado mediante reação de quimiluminescência (ECL) usando o aparelho ChemiDoc (BioRad, CA, USA) e os blots foram visualizados e quantificados (número de pixels) pelo sistema Scion Image, fornecido gratuitamente pela NIH (EUA) via internet. Os resultados foram expressos em porcentagem do controle.

4.18 Estatística

Inicialmente a distribuição dos dados foi testada por meio do teste de Shapiro-Wilk e a homoscedasticidade por meio do teste de Levene. Como os dados são independentes, devem apresentar distribuição normal e variâncias homogêneas, os pressupostos para o alcance de análises paramétricas. Os dados foram analisados utilizando a análise de variância ANOVA de duas vias, para comparar os valores dos grupos e teste de Tukey como *post-hoc* utilizando o *Software* GraphPad Prisma

(Califórnia, EUA). Foi adotado para todos os experimentos um $p < 0,05$ de significância. Todos os resultados foram apresentados na forma de média \pm erro padrão da média (EPM).

5. RESULTADOS DISCUTIDOS

A seguir, descreveremos os resultados obtidos na primeira etapa do estudo.

5.1 Caracterização do modelo de caquexia no tumor Walker-256 associado a hipertensão arterial

Quando analisamos o peso corporal total dos animais não houve diferenças estatísticas entre os grupos (Fig. 6.A). Por outro lado, o grupo ShrT ($259,4 \pm 8,49$ g; $p < 0,05$) mostrou uma redução do peso livre de tumor (Fig. 6.B) comparado aos grupos WkyC ($289,4 \pm 5,47$ g), ShrC ($290,5 \pm 6,95$ g) e WkyT ($286,3 \pm 6,35$ g).

A Figura 6.C mostra a progressão do crescimento tumoral ao longo do protocolo experimental. No dia 09/dez o grupo ShrT ($18,98 \pm 4,77$ cm³; $p < 0,05$) apresentou um volume tumoral maior em comparação ao grupo WkyT ($8,42 \pm 1,59$ cm³). Todas as medidas de volume tumoral subsequentes apresentam diferença do grupo ShrT com volume tumoral maior em comparação ao grupo WkyT (11/dez; ShrT: $25,46 \pm 5,04$ cm³; $p < 0,0001$ vs. WkyT: $9,55 \pm 1,80$ cm³. 13/dez; ShrT: $30,39 \pm 7,44$ cm³; $p < 0,0001$ vs. WkyT: $11,02 \pm 2,48$ cm³. 15/dez; ShrT: $35,27 \pm 6,18$ cm³; $p < 0,0001$ vs. WkyT: $13,54 \pm 2,93$ cm³). O peso do tumor foi maior no grupo ShrT ($1,01 \pm 0,07$ g/mm; $p < 0,0001$) comparado ao grupo WkyT ($0,42 \pm 0,06$ g/mm) (Fig. 6.D).

O músculo sóleo do grupo WkyT ($0,0032 \pm 0,000058$ g/mm; $p < 0,05$) teve uma redução no seu peso comparado ao grupo WkyC ($0,0036 \pm 0,000050$ g/mm). Houve uma redução também no grupo ShrT ($0,0031 \pm 0,00011$ g/mm; $p < 0,01$) quando comparado ao grupo WkyC ($0,0036 \pm 0,000050$) (Fig. 6.E).

No plantar (Fig. 6.F), o grupo ShrC ($0,0071 \pm 0,00022$ g/mm; $p < 0,01$) apresentou uma redução no peso comparado ao grupo WkyC ($0,0084 \pm 0,00014$ g/mm). O grupo WkyT ($0,0072 \pm 0,00028$ g/mm; $p < 0,01$) mostrou uma redução também em

comparação ao grupo WkyC ($0,0084 \pm 0,00014$ g/mm). Quando analisamos o grupo ShrT ($0,0064 \pm 0,00027$ g/mm; $p < 0,0001$) encontramos uma redução comparado ao grupo WkyC ($0,0084 \pm 0,00014$ g/mm). O grupo ShrT ($0,0064 \pm 0,00027$ g/mm; $p < 0,05$) também apresentou uma redução quando comparado ao grupo WkyT ($0,0072 \pm 0,00028$ g/mm).

Na Figura 6.G é possível observar uma redução do peso no gastrocnêmio do grupo ShrC ($0,034 \pm 0,00096$ g/mm; $p < 0,001$) comparado ao grupo WkyC ($0,039 \pm 0,00067$ g/mm). O grupo WkyT ($0,035 \pm 0,00062$ g/mm; $p < 0,05$) mostrou uma redução no peso do gastrocnêmio comparado ao grupo WkyC ($0,039 \pm 0,00067$ g/mm). O grupo ShrT ($0,029 \pm 0,001$ g/mm; $p < 0,001$), por sua vez, mostrou uma redução comparado ao seu grupo WkyC ($0,039 \pm 0,00067$ g/mm). Há uma redução também quando comparamos o grupo ShrT ($0,029 \pm 0,001$ g/mm; $p < 0,01$) com o grupo ShrC ($0,034 \pm 0,00096$ g/mm). Por fim, o grupo ShrT ($0,029 \pm 0,001$ g/mm; $p < 0,0001$) também mostrou uma redução comparado ao grupo WkyT ($0,035 \pm 0,00062$ g/mm).

A gordura retroperitoneal (Fig. 6.H) reduziu apenas no grupo ShrT ($0,065 \pm 0,0066$ g/mm; $p < 0,01$) em comparação tanto ao grupo WkyC ($0,099 \pm 0,0047$ g/mm), ShrC ($0,095 \pm 0,0063$ g/mm) quanto ao grupo WkyT ($0,097 \pm 0,0068$ g/mm). Em relação a gordura epididimal (Fig. 6.I), houve uma redução no grupo ShrC ($0,057 \pm 0,0035$ g/mm; $p < 0,0001$) comparado ao grupo WkyC ($0,09 \pm 0,0032$ g/mm). O grupo ShrT ($0,042 \pm 0,0035$ g/mm; $p < 0,0001$) mostrou uma redução em comparação ao grupo WkyC ($0,09 \pm 0,0032$ g/mm), em que também houve uma redução no grupo ShrT ($0,042 \pm 0,0035$ g/mm; $p < 0,05$) comparado ao grupo ShrC ($0,057 \pm 0,0035$ g/mm). Quando comparamos ambos os grupos com tumor observamos uma redução de gordura no grupo ShrT ($0,042 \pm 0,0035$ g/mm; $p < 0,0001$) em comparação ao grupo WkyT ($0,089 \pm 0,003$ g/mm).

A Figura 6.J mostra o peso do baço. Como podemos observar, o grupo WkyT ($0,032 \pm 0,004$ g/mm; $p < 0,0001$) apresentou um aumento em relação ao grupo controle WkyC ($0,015 \pm 0,00025$ g/mm). O grupo ShrT ($0,019 \pm 0,002$ g/mm; $p < 0,01$), por sua vez, apresentou uma redução quando comparado ao grupo WkyT ($0,032 \pm 0,004$ g/mm).

Como observamos em nossa padronização e nos dados da literatura (GERALDELLI et al., 2020; MOREIRA et al., 2018, 2019), o peso total dos animais muitas vezes acaba não se diferenciando, porém encontramos uma redução no peso livre do tumor somente no grupo ShrT comparado aos demais grupos. Contudo, o efeito da associação entre a HA e o câncer provocou um maior crescimento tumoral no grupo ShrT, conseqüentemente foi o único grupo que apresentou menor peso corporal livre de tumor comparado aos demais grupos avaliados associado a um maior peso do tumor no grupo ShrT comparado ao grupo WkyT.

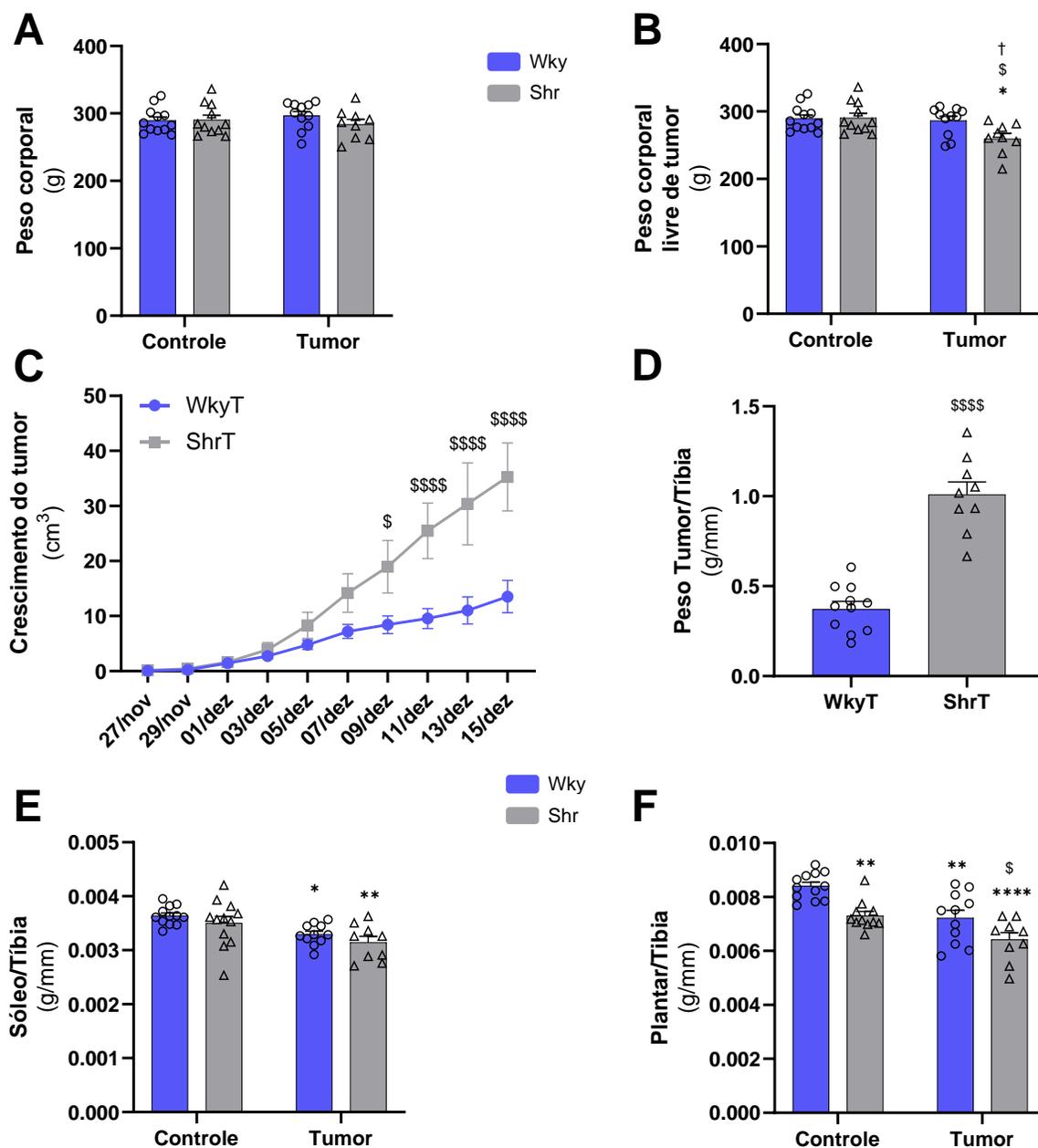
A HA está associada a uma série de alterações no músculo esquelético, incluindo diminuição no tamanho e porcentagem das fibras tipo I, função contrátil alterada e sinalização apoptótica elevada (BLOEMBERG et al., 2014). O modelo Walker-256 também é conhecido por gerar caquexia muscular, em que vários estudos mostram que o desenvolvimento do tumor induz uma redução do peso muscular (MOREIRA et al., 2019; PADILHA et al., 2017). Nossos dados mostram que a HA gerou uma perda de peso nos músculos plantar e gastrocnêmio (ShrC), e o desenvolvimento do tumor também gerou uma perda de peso nos músculos sóleo, plantar e gastrocnêmio no grupo WkyT. Entretanto, a associação da HA e do câncer gerou um efeito ainda maior sobre esta perda de peso nos músculos plantar e gastrocnêmio.

Esta perda de massa muscular pode ser acompanhada pela perda de tecido adiposo contribuindo para o quadro de caquexia. Os animais Shr são conhecidos por terem menor peso de adipócitos, quando comparados aos animais normotensos, isso se dá pelo seu perfil hipolipodistrófico (BORGHI et al., 2019, 2020). O tumor Walker-256 também gera perda de gordura, como efeito da caquexia presente no modelo experimental (FATIMA SILVA et al., 2020; VIANA et al., 2021). Os animais do grupo ShrT apresentaram perda de gordura exacerbada, tanto a retroperitoneal quanto a epididimal; já o grupo ShrC teve uma redução somente na gordura epididimal, sugerindo uma maior gravidade da caquexia na associação das duas doenças.

O baço é conhecido por ser uma importante fonte de citocinas pró-inflamatórias e células imunes (BANDONI et al., 2021). O crescimento anormal do baço, visto no grupo WkyT e ShrT, é conhecido como esplenomegalia. Esta patologia pode dar origem a

complicações devido à redução do número de glóbulos vermelhos, glóbulos brancos e plaquetas na corrente sanguínea, tornando o organismo mais suscetível a infecções, anemias e hemorragias. Pode ser caracterizada de três formas: aumento da função esplênica, infiltração ou congestão. Condições malignas, benignas ou metabólicas também podem levar à esplenomegalia (MCKENZIE et al., 2018).

Com isto, mostramos que a associação da HA e câncer gera um quadro acentuado de caquexia, acompanhada de um maior crescimento e volume tumoral.



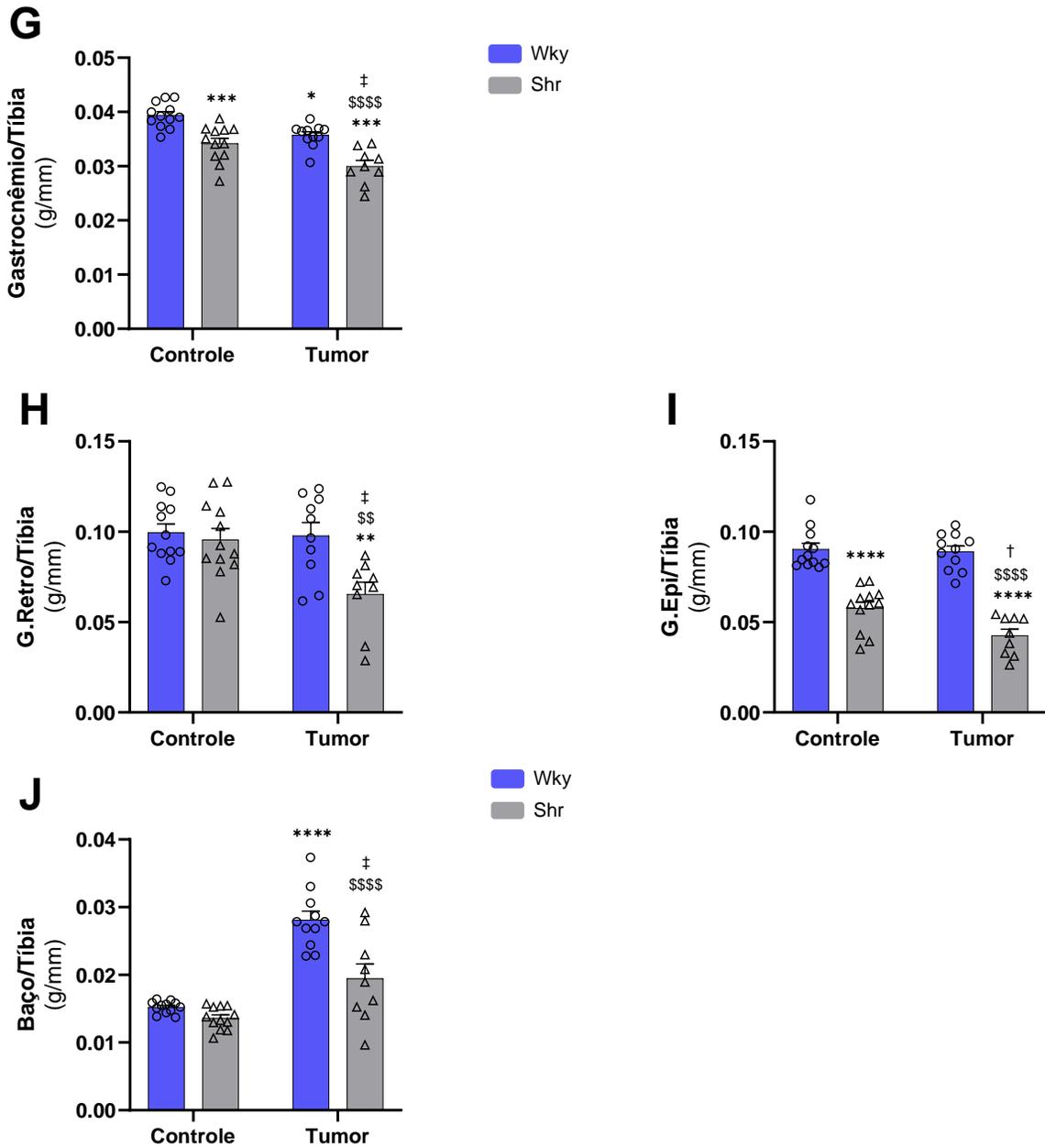


Figura 6. Efeitos da relação bidirecional da HA e câncer Walker-256 na caquexia.

Os resultados de peso corporal (A) e peso livre de tumor (B) foram expressos em grama (g). O crescimento tumoral (C) foi avaliado em centímetros cúbicos (cm³). Os resultados de peso do tumor (D) e dos músculos sóleo (E), plantar (F) e gastrocnêmio (G) foram expressos em gramas (g) divididos pelo comprimento da tibia (mm), para correção. Analisamos também a gordura retroperitoneal (G.Retro), gordura epididimal

(G.Epi) e o baço , Figuras H, I e J. Grupos: WkyC, indica Wistar Kyoto Controle (n = 12); WkyT, Wistar Kyoto Controle Tumor (n = 11); ShrC, Shr Controle (n = 12) e ShrT Tumor (n = 9). Os resultados são expressos como média \pm EPM. Análise estatística: Teste T e *Two-way* ANOVA, teste *post hoc* de Tukey. Diferença significativa vs. *WkyC, $p < 0,05$; **WkyC, $p < 0,01$; ***WkyC, $p < 0,001$; ****WkyC, $p < 0,0001$; †ShrC, $p < 0,05$; ‡ShrC, $p < 0,01$ \$WkyT, $p < 0,05$; \$\$WkyT $p < 0,01$; \$\$\$WkyT, $p < 0,0001$.

5.2 Capacidade funcional na relação bidirecional da HA e câncer

Não houve diferença no teste de tolerância ao esforço no teste pré-protocolo experimental entre todos os grupos, tanto em relação à distância percorrida (Fig. 7.A) quanto ao tempo de teste (Fig. 7.B). Na Figura 7.A, podemos observar que o grupo WkyT apresentou uma redução na distância do teste ($458 \pm 44,33$ m; $p < 0,01$) em relação ao grupo WkyC ($695,9 \pm 40,82$ m) pós-protocolo experimental. Quando analisamos os dados de pré e pós-teste do grupo WkyT em relação a distância, houve uma redução na distância de teste (pré: $770,6 \pm 27,41$ m; pós: $458 \pm 44,33$ m; $p < 0,05$). O grupo ShrT apresentou uma redução mais evidenciada em relação a distância ($297 \pm 50,81$ m; $p < 0,001$) comparado ao ShrC ($593,4 \pm 12,93$ m). Na comparação entre o pré e pós-teste, o grupo ShrT reduziu sua distância no pós-teste (pré: $677,6 \pm 36,39$ m; pós: $297 \pm 50,81$ m; $p < 0,0001$). Quando avaliamos o tempo de teste pós-protocolo, representado na Figura 7.B, observamos resultados similares ao de distância, em que o grupo WkyT reduziu o tempo de teste comparado ao grupo WkyC (WkyT: $28,14 \pm 1,49$ min; $p < 0,05$ vs. WkyC: $35,27 \pm 1,20$ min). Ao compararmos o tempo de teste pré e pós, o grupo WkyT reduziu seu resultado de teste (pré: $34,63 \pm 1,14$ min; pós $28,14 \pm 1,49$ min; $p < 0,05$). O grupo ShrT teve uma redução no seu tempo de teste comparado ao grupo ShrC (ShrT: $21,27 \pm 2,78$ min; $p < 0,0001$ vs. ShrC: $32,59 \pm 0,37$ min). Houve uma redução no tempo de teste do grupo ShrT ($21,27 \pm 2,78$ min; $p < 0,05$) comparado ao grupo WkyT ($28,14 \pm 1,49$ min). Em relação ao tempo de teste pré e pós, o grupo ShrT apresentou uma redução em seu teste comparado a sua pré-avaliação (pré: $34,83 \pm 1,02$ min; pós: $21,27 \pm 2,78$ min; $p < 0,0001$).

Ao realizarmos o *grip strength*, na Figura 7.C, observamos uma redução de força no grupo ShrT ($1662,1 \pm 94,87$ g; $p < 0,001$) comparado ao grupo controle WkyC ($2033,7 \pm 70,25$ g). O grupo ShrT ($1662,1 \pm 94,87$ g; $p < 0,0001$) também apresentou uma redução

comparado ao grupo ShrC ($2263,7 \pm 84,99$ g). Quando analisamos ambos os grupos com tumor, o grupo ShrT ($1662,1 \pm 94,87$ g; $p < 0,05$) mostrou redução na força em comparação ao grupo WkyT ($1990 \pm 35,26$ g).

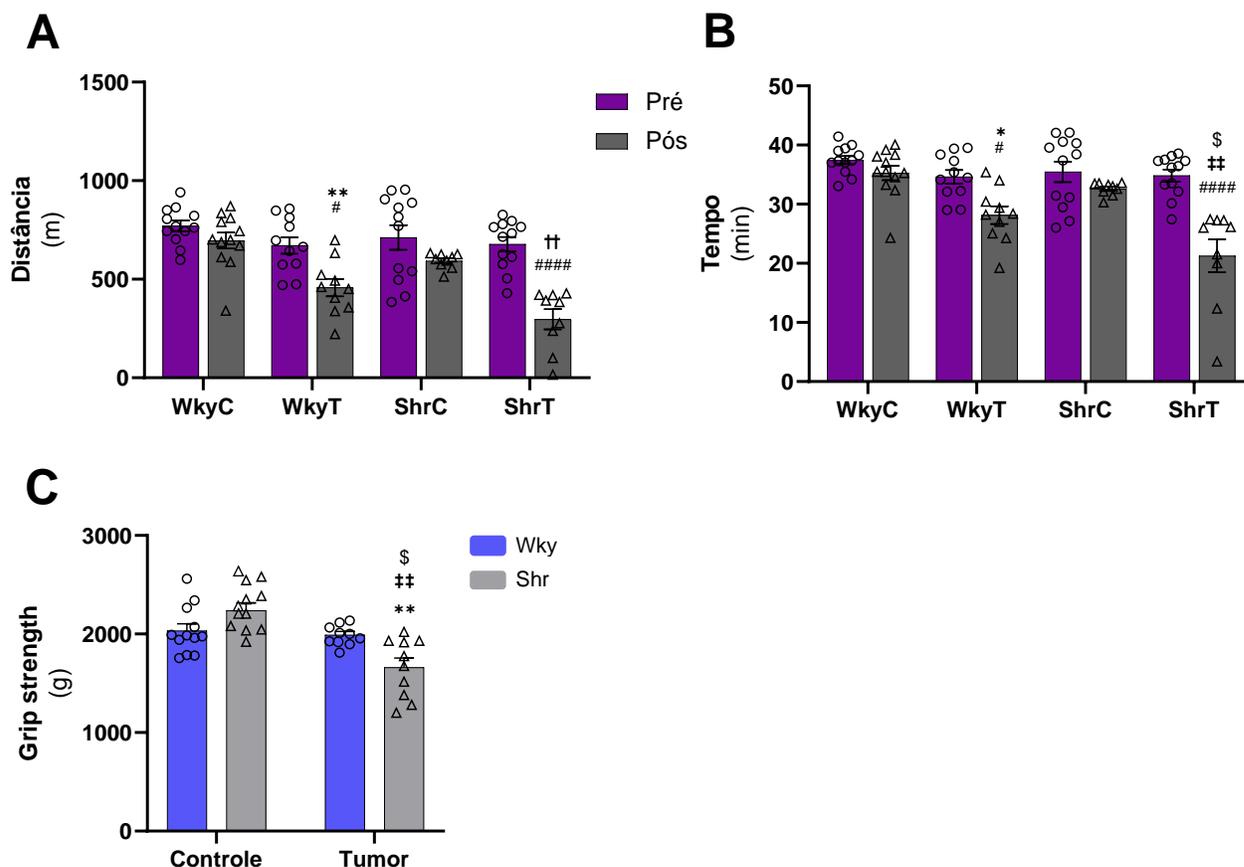


Figura 7. Influência da associação da HA e tumor Walker-256 na capacidade funcional.

Os resultados de distância foram expressos em metros (m) e os resultados de tempo de teste foram expressos em minutos (min). Em relação ao *grip strength* os resultados foram expressos em gramas (g). Grupos: WkyC, indica Wistar Kyoto Controle (n = 12); WkyT, Wistar Kyoto Controle Tumor (n = 11); ShrC, Shr Controle (n = 12) e ShrT Tumor (n = 9). Os resultados são expressos como média \pm EPM. Análise estatística: *Two-way* ANOVA, teste *post hoc* de Tukey. Diferença significativa vs. # indica a diferença entre pré-teste e pós-teste. (#) $p < 0,05$; (#####) $p < 0,0001$. *WkyC, $p < 0,05$; **WkyC, $p < 0,01$; ††ShrC, $p < 0,001$; ‡‡ShrC, $p < 0,0001$; \$WkyT, $p < 0,05$.

5.3 Medidas cardiovasculares na relação bidirecional da HA e câncer

Quando medimos a PAS pré, não encontramos diferença entre os grupos WkyC e WkyT. Como esperado, o grupo ShrC (189 ± 3 mmHg; $p < 0,0001$) mostrou um aumento

na PAS em comparação ao grupo WkyC (146 ± 3 mmHg). O grupo ShrT (195 ± 2 mmHg; $p < 0,0001$) mostrou um aumento na PAS pré em comparação ao grupo WkyT (145 ± 4 mmHg) (Fig. 8.A).

A PAS pós-protocolo, o grupo WkyT não apresentou diferença em relação ao grupo WkyC. A PAS do grupo ShrC (189 ± 4 mmHg; $p < 0,0001$) estava aumentada em comparação ao grupo WkyC (135 ± 3 mmHg). Quando analisamos os dados pós protocolo do grupo ShrT, encontramos uma redução quando comparado ao seu pré-teste (pré: 195 ± 2 mmHg; pós: 162 ± 3 mmHg; $p < 0,0001$). Houve uma redução da PAS no grupo ShrT (162 ± 3 mmHg; $p < 0,0001$) comparado ao grupo ShrC (189 ± 4 mmHg). Também foi visto um aumento da PAS no grupo ShrT (162 ± 3 mmHg; $p < 0,05$) em comparação ao grupo WkyT (144 ± 4) (Fig. 8.A).

No grupo ShrC (377 ± 6 bpm; $p < 0,0001$), a FC estava maior em comparação ao grupo WkyC (322 ± 5 bpm). O grupo ShrT (368 ± 6 bpm; $p < 0,001$) apresentou uma FC maior em comparação ao grupo WkyC (322 ± 5 bpm). Esta diferença na FC foi observada quando comparamos o grupo ShrT (368 ± 6 bpm; $p < 0,0001$) com o grupo WkyT (310 ± 7 bpm) (Fig. 8.B).

Em um estudo utilizando o modelo de câncer C26 os pesquisadores mostraram que animais após 18 dias de inóculo tumoral apresentaram redução da PAS. Ainda, os autores destacaram que esta redução da PAS representa consequências circulatórias indicando uma disfunção miocárdica após 18 dias de inóculo (STEVENS et al., 2015). Nossos resultados mostram que não houve influência do tumor na PA do grupo WkyT; no entanto, houve uma redução da PAS no grupo ShrT tanto comparado ao seu controle (ShrC) quanto comparado ao seu pré-teste.

Em relação a FC, estudos mostram estes níveis maiores em Shr em comparação a animais Wky. Essa diferença foi observada até a quarta semana de vida. Após este período, a FC apresentou uma redução até na sexta semana, até se igualar ao Wky (DICKHOUT; LEE, 1998). Um recente estudo utilizando animais com quatro semanas de idade mostrou um aumento na FC nos animais Shr e o treinamento de escada foi capaz de reduzir esta FC comparado aos animais que não se exercitaram (TAN et al., 2022). Nossos dados mostraram que o tumor Walker-256 não provocou influência na FC; no entanto, os animais Shr tiveram um aumento comparado tanto ao grupo WkyC quanto ao

grupo WkyT, sendo assim uma influência da HA sobre a FC, já que a relação bidirecional não promoveu alterações neste parâmetro.

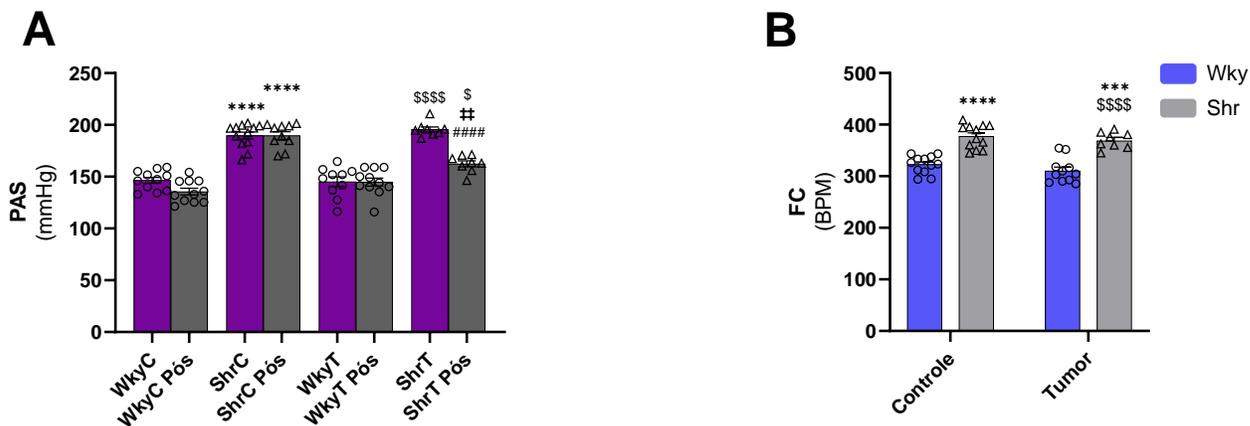


Figura 8. Medidas cardiovasculares na associação da HA e câncer.

Pressão arterial sistólica (PAS), foi expressa em milímetros de mercúrio (mmHg). A frequência cardíaca (FC) foi expressa em batimentos por minuto (bpm). Grupos: WkyC, indica Wistar Kyoto Controle (n = 12); WkyT, Wistar Kyoto Controle Tumor (n = 11); ShrC, Shr Controle (n = 12) e ShrT Tumor (n = 8). Os resultados são expressos como média \pm EPM. Análise estatística: *Two-way* ANOVA, teste *post hoc* de Tukey. Diferença significativa vs. # indica a diferença entre pré-teste e pós-teste. (#####) $p < 0,0001$; ***WkyC, $p < 0,001$; ****WkyC, $p < 0,0001$; \$WkyT, $p < 0,05$; \$\$\$\$WkyT, $p < 0,0001$; ††ShrC, $p < 0,0001$.

5.4 Análise de função cardíaca na relação bidirecional da HA e câncer

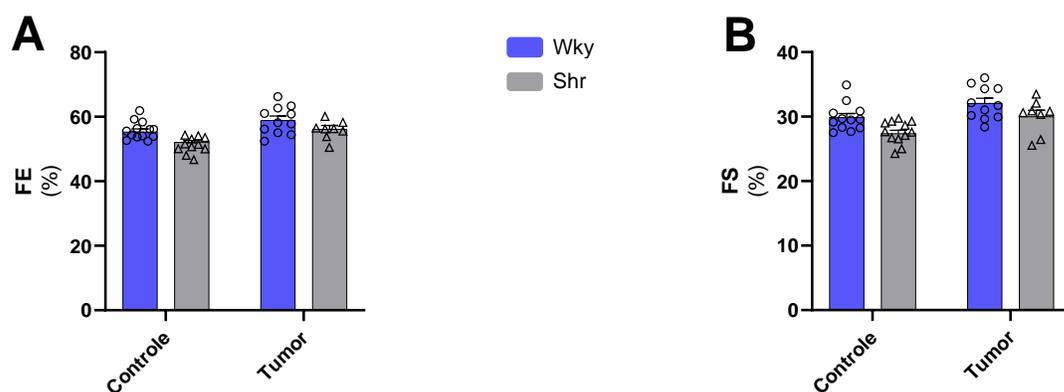
Não encontramos diferenças na função sistólica nas medidas de fração de ejeção (Fig. 9.A) e fração de encurtamento (Fig. 9.B).

Ao analisarmos o Tempo de Contração Isovolumétrico (IVCT) (Fig. 9.C) encontramos uma redução no grupo ShrC ($17,34 \pm 1,57$; $p < 0,05$) comparado ao grupo WkyC ($14,34 \pm 0,79$). O Tempo de Relaxamento Isovolumétrico (IVRT) (Fig. 9.D) estava aumentado no grupo ShrC ($23,92 \pm 0,76$ ms; $p < 0,001$) comparado ao grupo WkyC ($19,27 \pm 0,42$ ms). O IVRT estava aumentado no grupo ShrT ($22,77 \pm 1,07$ ms; $p < 0,05$) comparado aos grupos WkyC ($19,27 \pm 0,42$ ms) e WkyT ($18,84 \pm 0,88$ ms) respectivamente. A desaceleração da onda E (MV Decel) (Fig. 9.E) estava reduzida no grupo ShrC ($17,78 \pm 1,80$ ms; $p < 0,01$) comparado ao grupo WkyC ($30,50 \pm 2,20$ ms).

Encontramos também uma redução da MV Decel no grupo ShrT ($22,44 \pm 4,46$ ms; $p < 0,01$) comparado aos grupos WkyC ($30,50 \pm 2,20$ ms) e WkyT ($33,46 \pm 3,17$ ms). Não encontramos diferença na MV E/A (Fig. 9.F) para ambos os grupos avaliados.

O índice de performance miocárdica (TEI) (Fig. 9.G) estava aumentado somente no grupo ShrT ($0,61 \pm 0,10$; $p < 0,05$) comparado ao grupo WkyT ($0,48 \pm 0,015$), sugerindo um prejuízo na função global cardíaca na associação HA e câncer.

Um estudo avaliando a função cardíaca de animais Wky e Shr mostrou um prejuízo na função sistólica na HA tardia na transição para um quadro de IC, em que os pesquisadores encontraram uma redução na FE e FS somente a partir da 16ª semana de vida sem modificações nos animais Wky (REZENDE et al., 2021). De fato, quando analisamos a FE e FS não encontramos diferenças em nenhum dos grupos experimentais, e a associação HA e câncer também mostrou não provocar influência. Tanto o IVRT quanto o MV Decel são utilizados como parâmetros para entender a função diastólica. Neste sentido, o IVRT está aumentado e o MV Decel está reduzido denotando um quadro de disfunção diastólica (DUPONT et al., 2012; LI et al., 2023). Um estudo mostrou em animais com 18 meses de idade um aumento do IVRT sugestivo de disfunção diastólica grave, com a FE preservada (LI et al., 2023). Corroborando, um aumento da TEI observado na associação da HA e câncer contribui para um prejuízo global da função cardíaca apenas na associação das doenças.



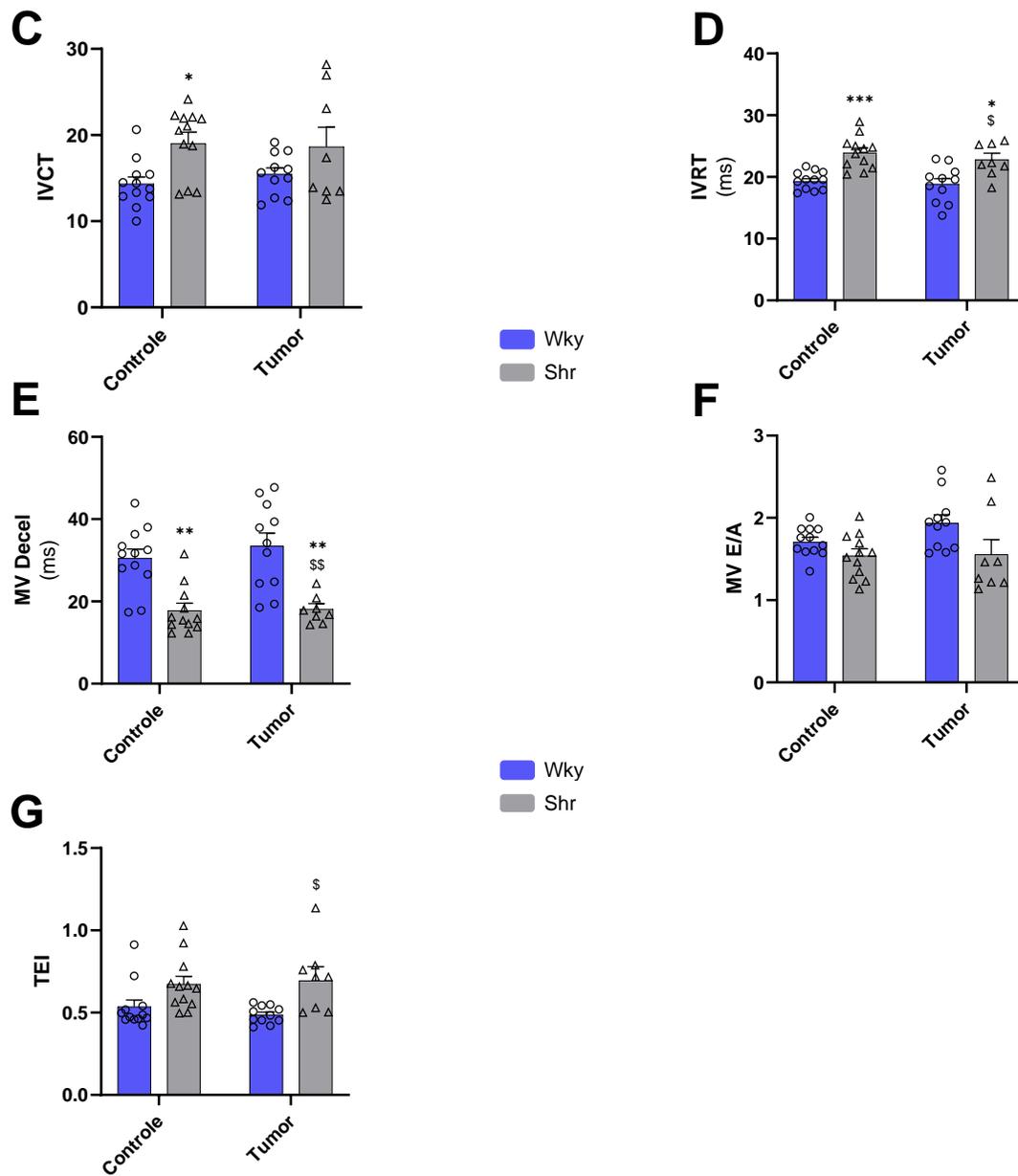


Figura 9. Função cardíaca pelo ecocardiograma.

Fração de ejeção (FE) (A) e fração de encurtamento (FS) (B) foram expressas em porcentagem (%). Tempo de Contração Isovolumétrico (IVCT) (C), tempo de relaxamento isovolumétrico (IVRT) (D) expresso em milissegundo (ms). A desaceleração da onda E (MV Decel) (E) também foi expressa em milissegundo (ms). Razão das ondas E/A (MV E/A) (F). Índice de performance miocárdica (TEI) (G). Grupos: WkyC, indica Wistar Kyoto Controle (n = 12); WkyT, Wistar Kyoto Controle Tumor (n = 11); ShrC, Shr Controle (n = 12) e ShrT Tumor (n = 9). Os resultados são expressos como média ± EPM. Análise estatística: *Two-way*

ANOVA, teste *post hoc* de Tukey. Diferença significativa vs. *WkyC, $p < 0,05$; **WkyC, $p < 0,01$; ***WkyC, $p < 0,001$; \$WkyT, $p < 0,05$; \$\$WkyT, $p < 0,01$.

5.5 Análise de morfologia cardíaca na relação bidirecional da HA e câncer

Para correção do peso dos tecidos, utilizamos o comprimento da tíbia como normalizador. Os dados mostram que não houve diferença entre os grupos para este normalizador.

Houve um aumento do peso do VE (Fig. 10.A) no grupo ShrC ($0,023 \pm 0,0004$ g/mm; $p < 0,05$) em comparação ao grupo WkyC ($0,021 \pm 0,0005$ g/mm). Por outro lado, houve uma redução de peso do VE no grupo ShrT ($0,020 \pm 0,0005$ g/mm; $p < 0,0001$) quando comparado ao grupo ShrC ($0,023 \pm 0,0004$ g/mm). Não observamos diferença estatística no peso do VD (Fig. 10.B).

Em relação ao peso do átrio (Fig. 10.C), o grupo ShrT ($0,0011 \pm 0,00004$ g/mm; $p < 0,01$) mostrou uma redução no peso em comparação ao grupo WkyC ($1,47 \pm 0,07$ g/mm). O grupo ShrT ($0,0011 \pm 0,00004$ g/mm; $p < 0,001$) também mostrou uma redução quando comparado ao grupo WkyT ($0,0015 \pm 0,00009$ g/mm).

A massa do VE corrigida (Fig. 10.D) no ecocardiograma estava reduzida no grupo ShrT (559 ± 20 mg; $p < 0,01$) comparada aos grupos ShrC (650 ± 20 mg) e WkyT (675 ± 25 mg).

O VDF (Fig. 10.E) e VSF (Fig. 10.F) apresentaram uma redução apenas no grupo ShrT (VDF: $411,7 \pm 14,51$ mm; $p < 0,05$; VSF: $173,9 \pm 11,08$ mm; $p < 0,05$) comparado ao grupo WkyT (VDF: $510,4 \pm 26,60$ mm; VSF: $221,9 \pm 9,79$ mm).

O septo interventricular na diástole (Fig. 10.G) mostrou estar aumentado no grupo ShrC ($1,05 \pm 0,02$ mm; $p < 0,001$) em comparação ao grupo WkyC ($0,83 \pm 0,03$ mm). Também houve um aumento no grupo WkyT ($0,98 \pm 0,02$ mm; $p < 0,05$) comparado ao WkyC ($0,83 \pm 0,03$ mm). Por fim, o grupo ShrT ($1,14 \pm 0,07$ mm; $p < 0,0001$) mostrou um aumento em comparação ao grupo WkyC ($0,83 \pm 0,03$ mm). Não houve diferença do septo interventricular na sístole (Fig. 10.H).

Quando analisamos o DDVE (Fig. 10.I) e DSVE (Fig. 10.J), o grupo ShrT (DDVE: $8,65 \pm 0,13$ mm; $p < 0,05$; DSVE: $5,89 \pm 0,16$ mm; $p < 0,01$) reduziu o diâmetro em ambas

as análises somente em comparação ao grupo WkyC (DDVE: $9,52 \pm 0,21$ mm; DSVE: $6,67 \pm 0,16$ mm).

A PP na diástole (Fig. 10.K) estava aumentada somente no grupo WkyT ($1,25 \pm 0,09$ mm; $p < 0,05$) em comparação ao grupo WkyC ($1,02 \pm 0,05$ mm). A PP na sístole (Fig. 10.L) não mostrou diferença.

Em relação a espessura relativa da parede (ERP) (Fig. 10.M) tivemos um aumento no grupo ShrC ($0,24 \pm 0,006$; $p < 0,01$) comparado ao grupo WkyC ($0,20 \pm 0,008$). Também tivemos um aumento no grupo ShrT ($0,27 \pm 0,01$; $p < 0,0001$; $p < 0,001$; $p < 0,05$) comparado aos grupos WkyC ($0,20 \pm 0,008$), WkyT ($0,25 \pm 0,02$) e ShrC ($0,24 \pm 0,006$) respectivamente.

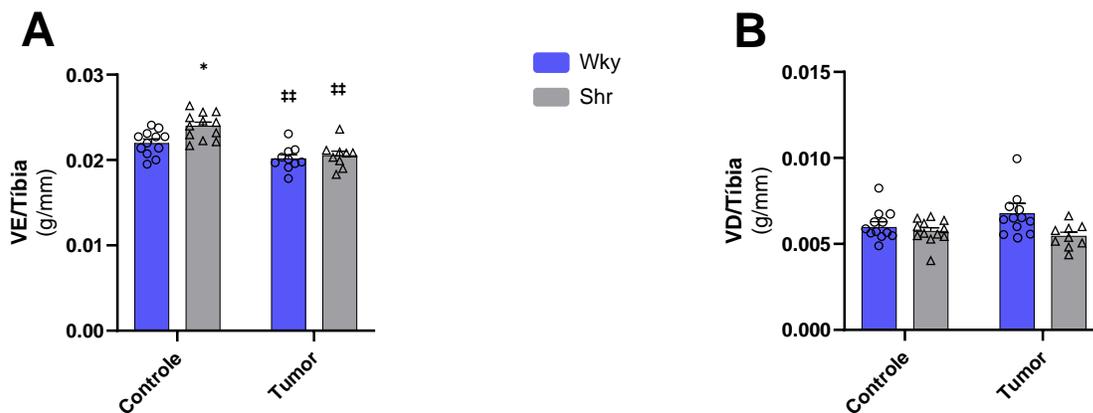
Quando analisamos a área de secção transversa dos cardiomiócitos (Fig. 10.N, O) do VE, encontramos uma redução na área do grupo ShrT ($399,7 \pm 11,71 \mu\text{m}^2$; $p < 0,05$) comparado ao grupo WkyC ($463 \pm 13,14 \mu\text{m}^2$) e ShrC ($458,8 \pm 12,15 \mu\text{m}^2$). A % de colágeno total foi aumentada no grupo ShrC ($0,14 \pm 0,01 \mu\text{m}$; $p < 0,0001$) comparado ao grupo WkyC ($0,03 \pm 0,005 \mu\text{m}$). O grupo WkyT ($0,23 \pm 0,02 \mu\text{m}$; $p < 0,0001$) teve um aumento na % de colágeno comparado ao grupo WkyC ($0,03 \pm 0,005 \mu\text{m}$). Além disso, o grupo ShrT ($0,40 \pm 0,02 \mu\text{m}$; $p < 0,0001$) apresentou um aumento de colágeno em comparação ao grupo WkyC ($0,03 \pm 0,005 \mu\text{m}$) e ShrC ($0,14 \pm 0,01 \mu\text{m}$). O mesmo aumento também foi observado em comparação ao grupo WkyT ($0,23 \pm 0,02 \mu\text{m}$) (Fig. 10.P, Q).

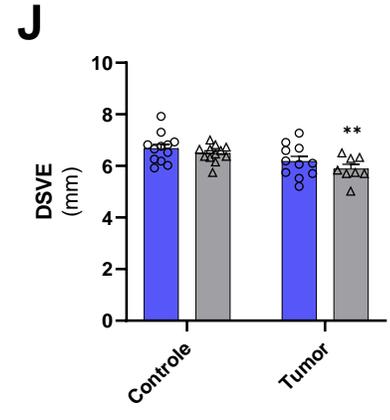
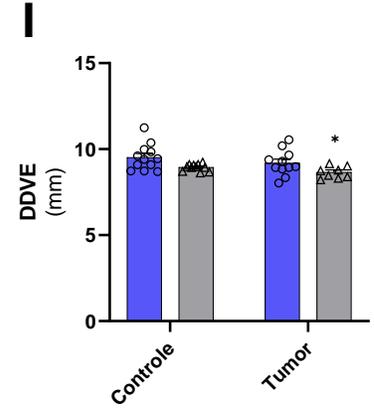
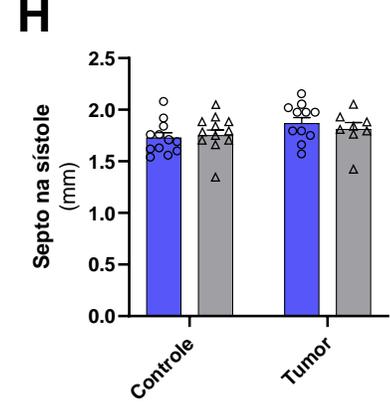
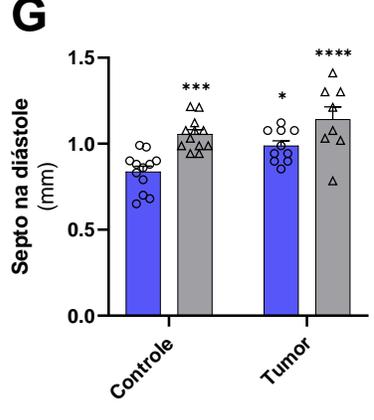
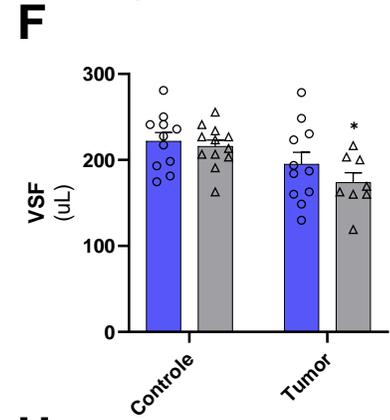
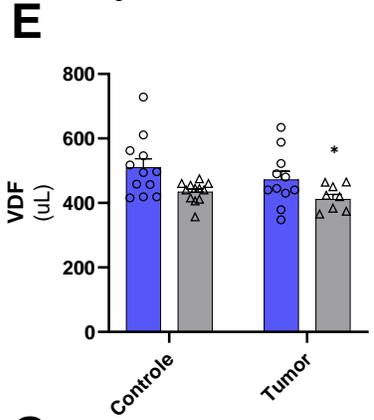
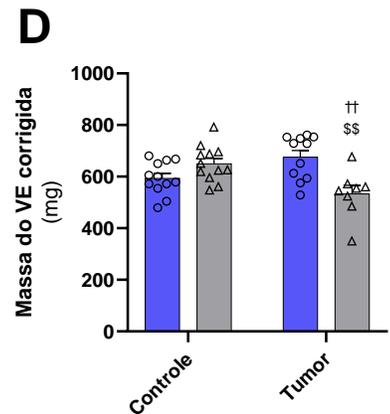
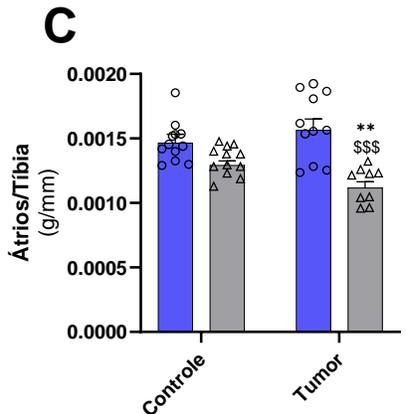
Estudos mostraram que animais SHR apresentaram um peso de coração maior comparado ao WKY. Este aumento foi atenuado quando os animais foram tratados com alamandina (análogo estrutural da Ang 1-7), responsável por atenuar a hipertrofia cardíaca (LIU et al., 2018). Nossos animais apresentaram um aumento do peso do VE somente no grupo ShrC, e quando associado ao câncer (ShrT) houve uma atenuação no peso do VE. Esta redução foi acompanhada por uma diminuição do peso dos átrios, que foi diferente somente no grupo ShrT em comparação tanto ao grupo WkyC quanto ao WkyT, mostrando que a associação câncer e HA exerce uma maior influência nesta redução.

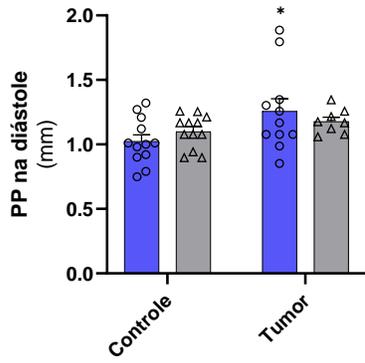
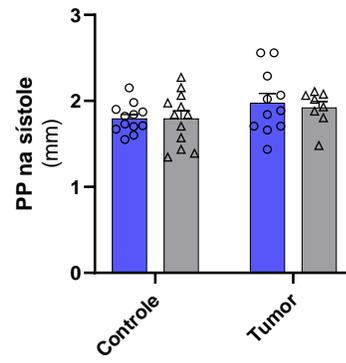
Uma revisão destacando o remodelamento cardíaco durante o câncer em diversos modelos tumorais apresentou as alterações mais comum entre os modelos, tais

como: diminuição da PP do VE, do septo interventricular e espessura da parede posterior. No entanto, para o modelo de tumor Walker-256, os autores apresentaram somente uma evidência de perda de peso do VE (BELLOUM; RANNOU-BEKONO; FAVIER, 2017). Nossos resultados mostram uma redução no grupo ShrT de VDF, VSF, DDVE, DSVE e ERP comparado ao grupo WkyC, um aumento do septo na diástole em todos os grupos comparados ao grupo WkyC. O grupo WkyT apresentou um aumento da PP na diástole comparado ao grupo WkyC.

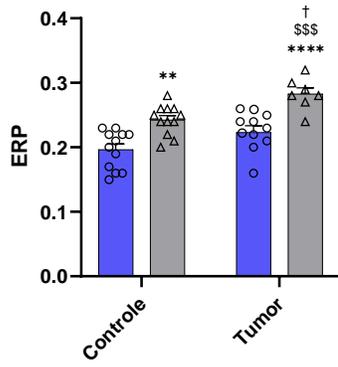
Também é conhecido que a atrofia cardíaca em animais com câncer está relacionada com a redução da área de secção transversa dos cardiomiócitos. Além disso, animais portadores de tumor C26 apresentaram fibrose cardíaca, que implica em uma diminuição do desempenho cardíaco com prejuízo de complacência ventricular (BELLOUM; RANNOU-BEKONO; FAVIER, 2017). Outro estudo utilizando animais Shr mostrou que a doença provoca um aumento de fibrose cardíaca e que o treinamento de escada foi capaz de atenuar a fibrose cardíaca destes animais (HONG et al., 2022). Nossos dados mostraram uma redução na área de secção transversa somente no grupo ShrT e que foi acompanhada de um aumento expressivo de fibrose visto pela % de colágeno total. Os animais do grupo ShrC apresentaram um aumento de fibrose, que foi similar ao grupo WkyT; no entanto, o grupo ShrT teve um aumento maior em comparação aos demais grupos, destacando assim que a associação da HA e o câncer gera um remodelamento no tecido cardíaco mais evidenciado neste grupo.



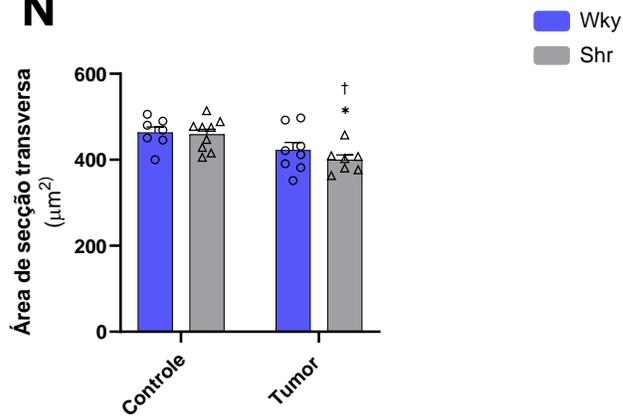


K**L**

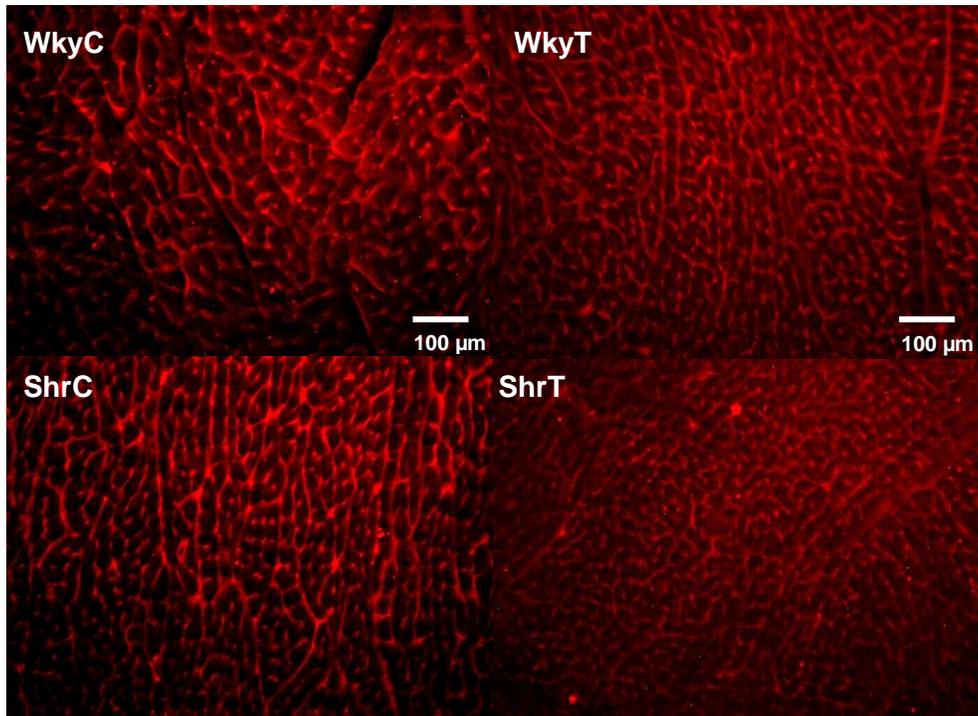
■ Wky
■ Shr

M

N



O



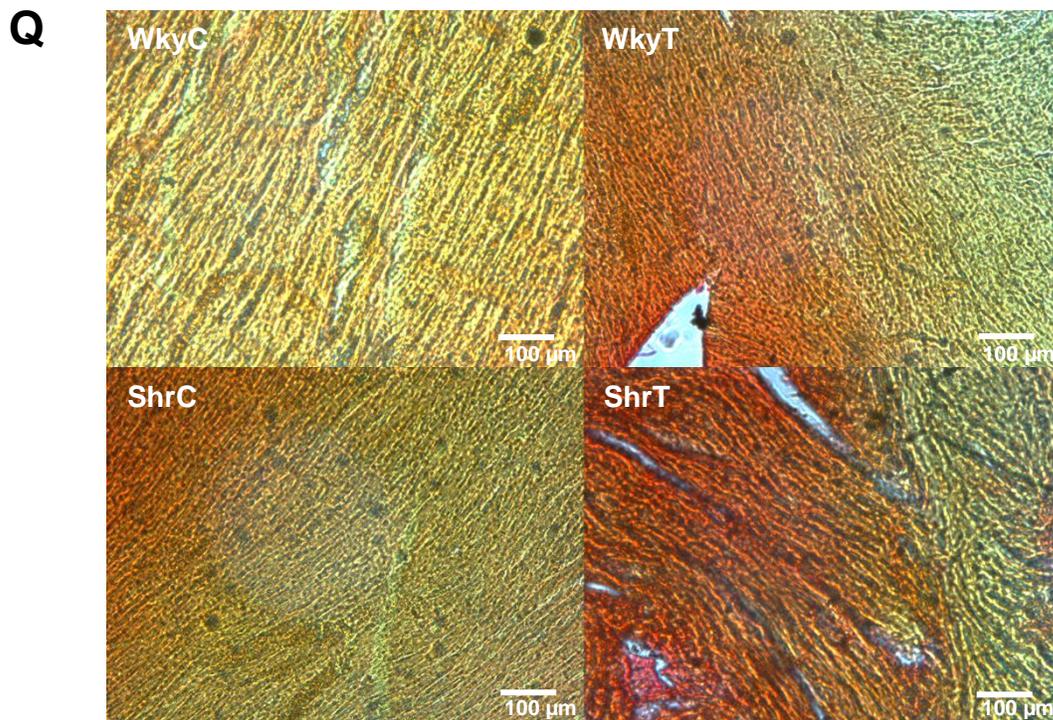
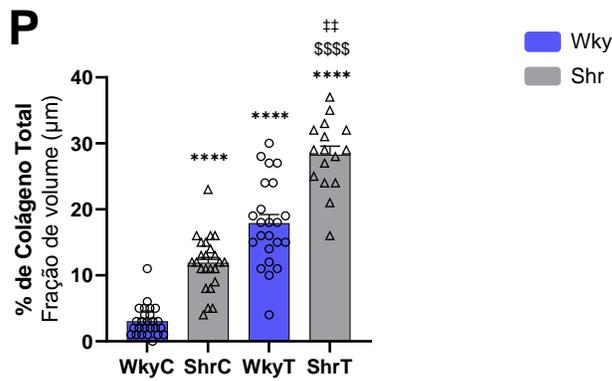


Figura 10. Alterações morfológicas cardíacas na associação da HA e câncer.

Os resultados foram corrigidos pelo comprimento da tibia representado em milímetros (mm). Ventriculo esquerdo (VE/tibia) (A), ventriculo direito (VD/tibia) (B), e átrios (Átrios/tibia) (C) foram expressos em grama (g) divididos pelo comprimento da tibia (mm). A massa do ventriculo esquerdo corrigida (D) foi expressa em miligrama (mg), o volume diastólico final (VDF) (E) e volume sistólico final (VSF) (F) foram medidos em microlitros (μL), o septo interventricular na diástole (G) e na sístole (H) foram expressos em milímetros (mm), diâmetro diastólico do ventriculo esquerdo (DDVE) (I), diâmetro sistólico do ventriculo esquerdo (DSVE) (J) e parede posterior (PP) na diástole e sístole (K,L) foram expressas em milímetros (mm) e espessura relativa da parede (ERP) (M). A área de secção transversa (N) foi expressa em micrômetro ao quadrado (μm^2), imagem representativa da coloração com WGA (O). Para representação do colágeno total (P) utilizamos a fração do volume expressa em micrômetro (μm), imagem representativa dos cortes corados

com Picrossirius-red (Q). Escala representativa de 100 micrômetros. Grupos: WkyC, indica Wistar Kyoto Controle (n = 12); WkyT, Wistar Kyoto Controle Tumor (n = 11); ShrC, Shr Controle (n = 12) e ShrT Tumor (n = 9). Os resultados são expressos como média \pm EPM. Análise estatística: *Two-way* ANOVA, teste *post hoc* de Tukey. Diferença significativa vs. *WkyC, p < 0,05; **WkyC, p < 0,01; ***WkyC, p < 0,001; ****WkyC, p < 0,0001; †ShrC, p < 0,05; ††ShrC, p < 0,001; †††ShrC, p < 0,0001; \$\$WkyT p < 0,01; \$\$\$WkyT p < 0,001; \$\$\$\$WkyT, p < 0,0001.

5.6 Proteínas sarcoméricas de remodelamento cardíaco patológico

Para análise de expressão gênica, utilizamos o gene 18s como normalizador, pois não mostrou diferença entre nenhum grupo (Fig. 11.A). A miosina de cadeia pesada do tipo alfa (α MHC) (Fig. 11.B) mostrou uma redução no grupo ShrT (75 \pm 8,4 % do controle; p < 0,01) comparado ao grupo ShrC (146 \pm 12,7 % do controle). Em relação à miosina de cadeia pesada do tipo beta (β MHC) (Fig. 11.C), o grupo WkyT (210 \pm 22,2 % do controle; p < 0,001) teve um aumento em relação ao grupo WkyC (100 \pm 13,2 % do controle) e o grupo ShrT (159 \pm 27,6 % do controle; p < 0,05) também apresentou um aumento em comparação ao grupo ShrC (83 \pm 8,7 % do controle). Quando realizamos a razão α MHC/ β MHC (Fig. 11.D), observamos uma redução no grupo ShrT (0,59 \pm 0,13; p < 0,05) comparado ao grupo ShrC (1,98 \pm 0,26), sugerindo uma alteração da proporção das isoformas de miosinas sarcoméricas no coração dos animais com a associação do câncer e HA, indicando um quadro de remodelamento cardíaco patológico.

Sabemos que um dos marcadores de lesão cardíaca é a troca da α MHC pela β MHC. Esta troca é conhecida por gerar uma disfunção cardíaca (KLOS et al., 2017; LOWES et al., 1997). Ao analisarmos a α MHC encontramos uma redução no grupo ShrT comparado ao grupo ShrC, e em contrapartida, um aumento na expressão da β MHC nos grupos WkyT e ShrT em comparação aos grupos controles (WkyC e ShrC), respectivamente. Quando analisamos a relação α MHC/ β MHC observamos uma diferença no grupo ShrT comparado ao grupo ShrC, indicando uma mudança em direção a um perfil de expressão de genes fetais com aumento de β MHC e característico de remodelamento cardíaco patológico.

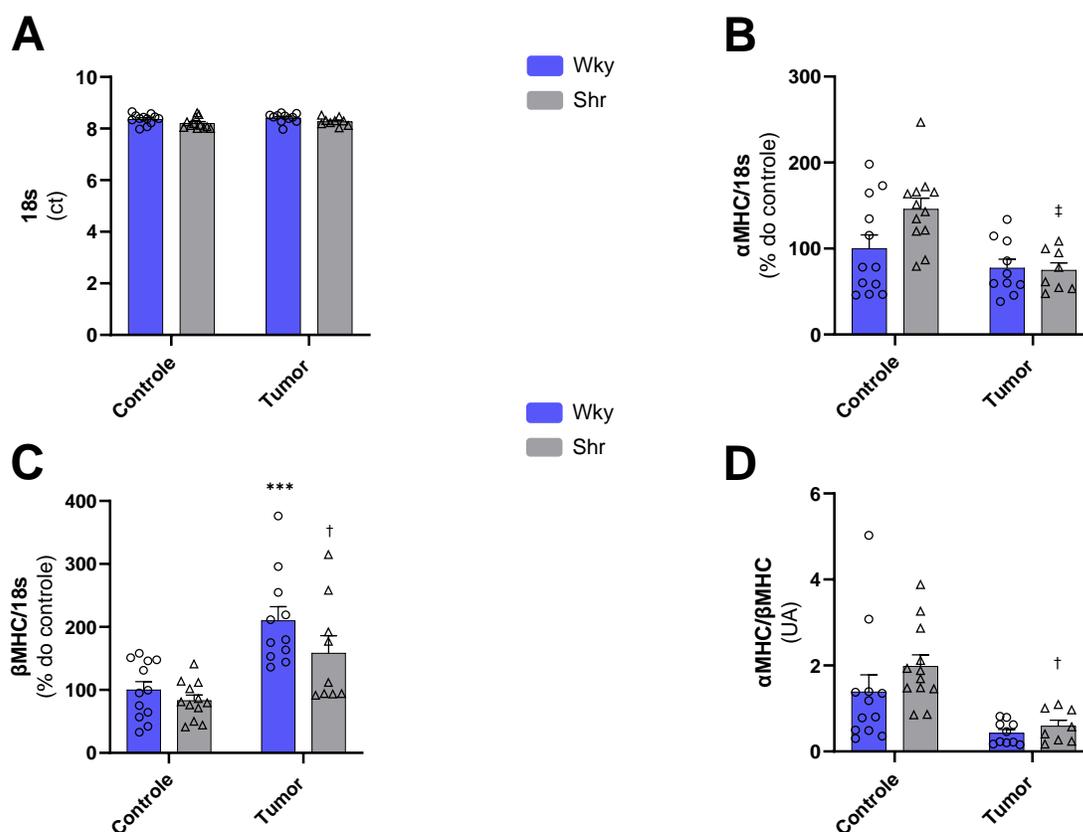


Figura 11. Expressão gênica de proteínas sarcoméricas do remodelamento cardíaco patológico. O resultado do normalizador 18s (A) foi expresso utilizando o método de limiar comparativo de ciclos (ct). Os resultados da expressão gênica foram expressos em porcentagem do controle (% do controle) para os genes: α MHC (B) e β MHC (C). Já a razão α MHC/ β MHC (D) foi expressa em unidade arbitrária (UA). Grupos: WkyC, indica Wistar Kyoto Controle (n = 12); WkyT, Wistar Kyoto Controle Tumor (n = 11); ShrC, Shr Controle (n = 12) e ShrT Tumor (n = 9). Os resultados são expressos como média \pm EPM. Análise estatística: *Two-way* ANOVA, teste *post hoc* de Tukey. Diferença significativa vs. ***WkyC, $p < 0,001$; †ShrC, $p < 0,05$; ‡ShrC, $p < 0,01$.

5.7 Marcadores inflamatórios cardíacos na relação bidirecional da HA e câncer

O gene do fator de necrose tumoral (TNF- α) (Fig. 12.A) foi aumentado no grupo ShrT ($168 \pm 7,9$ % do controle; $p < 0,0001$) em comparação ao grupo WkyC ($100 \pm 4,5$ % do controle). Houve também um aumento no grupo ShrT ($168 \pm 7,9$ % do controle; $p < 0,01$) tanto comparado ao grupo ShrC ($104 \pm 7,6$ % do controle) quando comparado ao grupo WkyT ($122 \pm 13,9$ % do controle). A interleucina 6 (IL-6) (Fig. 12.B) aumentou

no grupo WkyT (280 ± 46 % do controle; $p < 0,001$) comparado ao grupo WkyC (100 ± 25 % do controle). O grupo ShrT ($236 \pm 29,5$ % do controle; $p < 0,05$) também aumentou os níveis de IL-6 comparado ao grupo WkyC (100 ± 25 % do controle) e ShrC ($106 \pm 17,2$ % do controle). Em relação a interleucina 10 (IL-10) (Fig. 12.C), houve um aumento no grupo WkyT ($539 \pm 30,5$ % do controle; $p < 0,0001$) comparado ao seu grupo controle WkyC ($100 \pm 7,4$ % do controle). O grupo ShrT ($339 \pm 39,1$ % do controle; $p < 0,0001$) também apresentou um aumento em relação ao grupo WkyC ($100 \pm 7,4$ % do controle) e ShrC ($51 \pm 4,4$ % do controle). Entretanto, houve uma redução do grupo ShrT ($339 \pm 39,1$ % do controle; $p < 0,0001$) comparado ao grupo WkyT ($539 \pm 30,5$ % do controle).

Para entendermos alguns efeitos da relação bidirecional da HA e do câncer, fomos analisar genes envolvidos no processo inflamatório, como TNF α e IL-6, também analisamos a IL-10 pelo seu papel anti-inflamatório. Um trabalho publicado em 2020, utilizando o modelo Walker-256, mostrou que o TNF α e a IL-6 avaliados sistemicamente estavam aumentados no grupo portador do tumor Walker (CELLA et al., 2020). Dados similares foram encontrados no modelo Shr, mostrando que os níveis de TNF α e IL-6 também estavam aumentados no grupo Shr controle (CHEN et al., 2021). Nossos dados, por sua vez, apresentam um aumento em relação ao TNF α somente no grupo ShrT, o qual estava maior em relação aos demais grupos, indicando uma maior ativação inflamatória para este marcador na associação das duas doenças. Em relação a IL-6, houve um aumento no grupo WkyT em comparação ao grupo controle (WkyC). No entanto, o grupo ShrT apresentou uma redução quando comparado ao grupo WkyT e um aumento comparado ao grupo WkyC. Assim, podemos destacar que ambos os grupos tumorais apresentaram um aumento do perfil inflamatório e que a associação de ambas as doenças favorece este ambiente, uma vez que foi acompanhada de um aumento tanto da IL-6 quanto do TNF α . Quando analisamos a IL-10, um marcador anti-inflamatório, observamos o mesmo aumento tanto no grupo somente portador de tumor WkyT quanto no grupo ShrT em comparação aos grupos WkyC e ShrC. No entanto, o grupo ShrT teve uma redução nos níveis de IL-10 comparados ao grupo WkyT, sugerindo uma piora do perfil anti-inflamatório na associação das doenças.

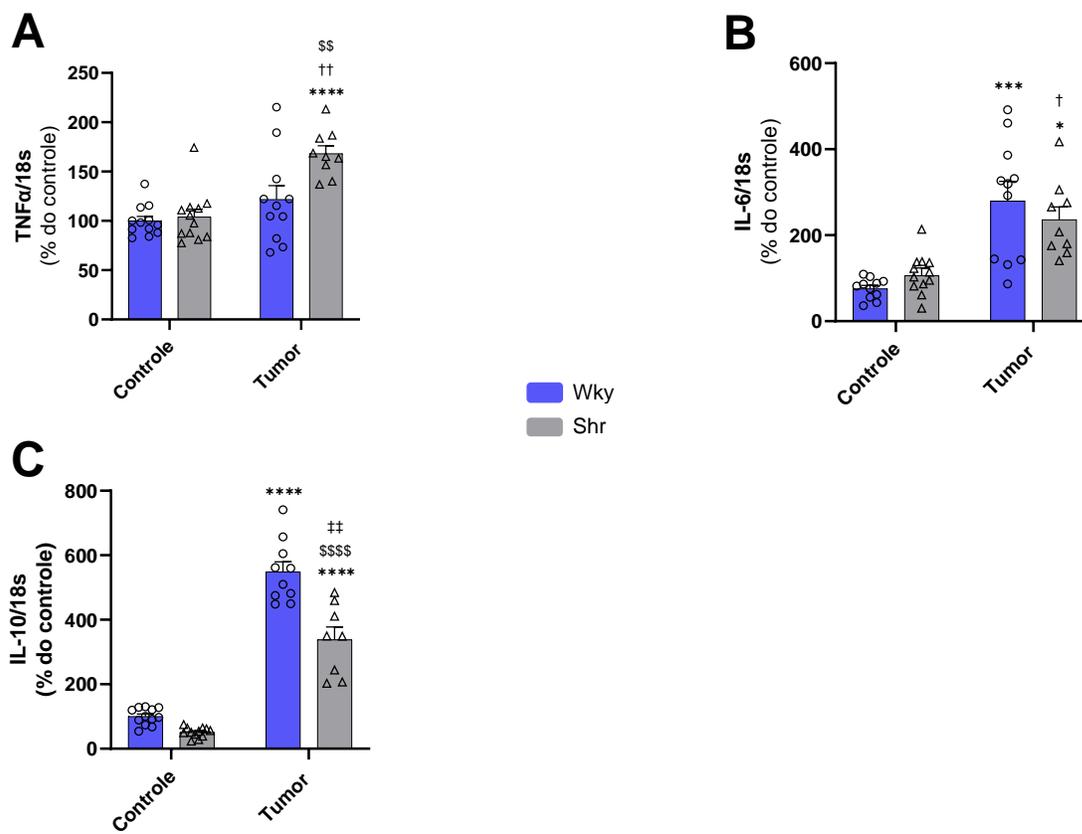


Figura 12. Expressão gênica de marcadores inflamatórios cardíacos na associação HA e câncer. O resultado do normalizador 18s foi expresso utilizando o método de limiar comparativo de ciclos ($2^{-\Delta\Delta C_t}$). Os resultados da expressão gênica foram expressos em porcentagem do controle (% do controle) para os genes: TNF α , IL-6 e IL-10. Grupos: WkyC, indica Wistar Kyoto Controle (n = 12); WkyT, Wistar Kyoto Controle Tumor (n = 11); ShrC, Shr Controle (n = 12) e ShrT Tumor (n = 9). Os resultados são expressos como média \pm EPM. Análise estatística: Two-way ANOVA, teste *post hoc* de Tukey. Diferença significativa vs. *WkyC, p < 0,05; ***WkyC, p < 0,001; ****WkyC, p < 0,0001; †ShrC, p < 0,05; ††ShrC, p < 0,001; †††ShrC, p < 0,0001; \$\$WkyT p < 0,01; \$\$\$\$WkyT, p < 0,0001.

5.8 Análises de síntese e degradação proteica cardíaca

Quando analisamos a expressão da proteína PI3K (Fig. 13.A) (fosfatidilinositol-3-quinase) normalizada pelo GAPDH, não encontramos diferenças estatísticas entre os grupos.

Já a p-AKT (Fig. 13.B) (Proteína quinase B fosforilada) normalizada pela AKT total, estava reduzida no grupo ShrC ($64 \pm 4,39$ % do controle; p < 0,0001) comparada ao grupo WkyC ($100 \pm 5,41$ % do controle). Houve um aumento na expressão da proteína

p-AKT/total no grupo ShrT ($102 \pm 4,91$ % do controle; $p < 0,0001$), quando comparado ao grupo ShrC ($64 \pm 4,39$ % do controle).

A razão p-4EBP1 (Fig. 13.E) (Proteína 1 ligante do fator de iniciação eucariótico 4E) normalizada pelo total, estava reduzida no grupo ShrT ($68 \pm 4,76$ % do controle; $p < 0,05$) comparado ao grupo WkyC ($100 \pm 7,88$ % do controle). Esta redução foi ainda mais acentuada ShrT ($68 \pm 4,76$ % do controle; $p < 0,001$) quando comparado ao grupo WkyT ($117 \pm 9,65$ % do controle).

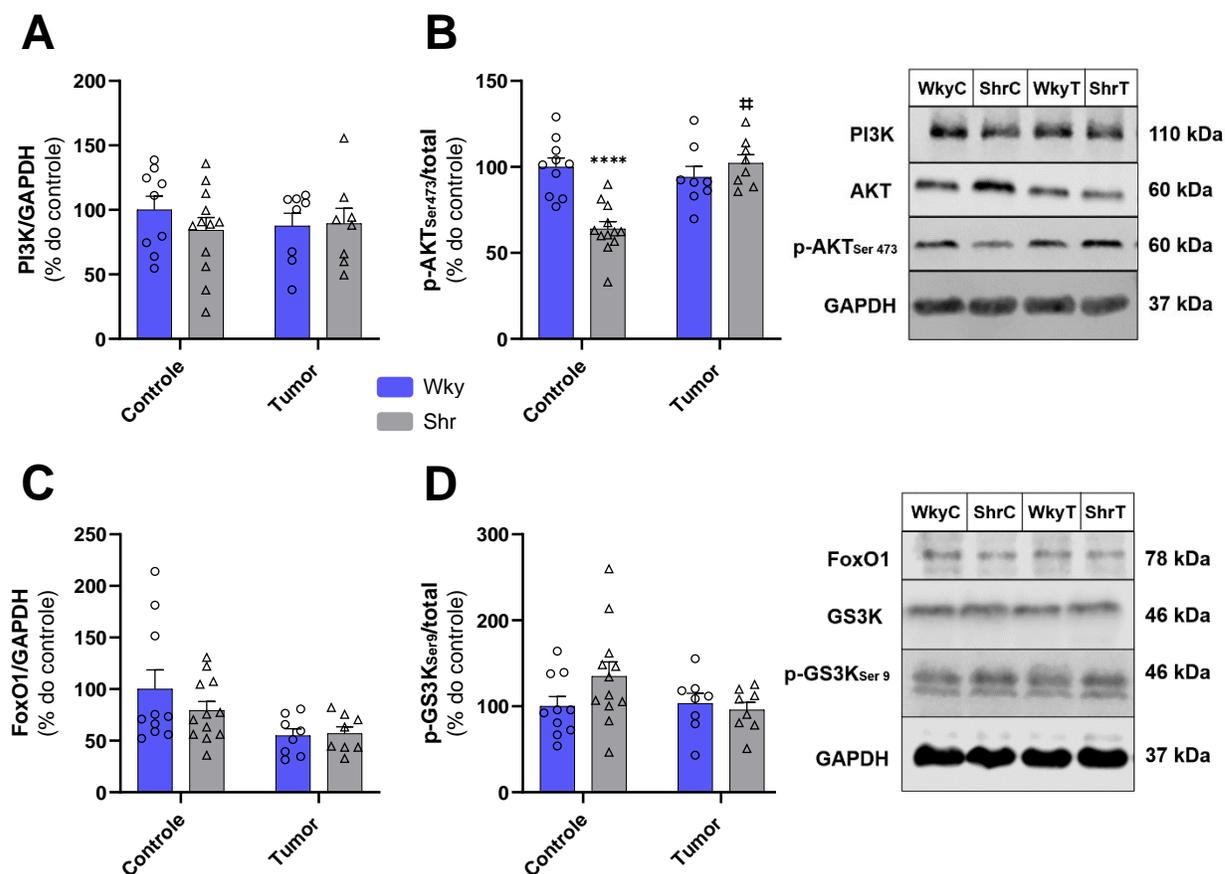
Não encontramos diferença na expressão das proteínas FoxO1 (Fig. 13.C) (Fatores de transcrição forkhead box O), p-GSK-3 (Fig. 13.D) (Glicogênio sintase quinase) normalizada pelo total, p-eIF4E (Fig. 13.F) (Fator de iniciação da tradução eucariótica 4E) normalizada pelo total.

Em contrapartida, a proteína p-p70S6k (Fig. 13.G) (p70 ribossomal S6 kinase) normalizada por GAPDH estava aumentada no grupo WkyT ($139 \pm 9,45$ % do controle; $p < 0,05$) comparada ao grupo WkyC ($100 \pm 7,88$ % do controle). Houve também um aumento no grupo ShrT ($149 \pm 14,39$ % do controle; $p < 0,01$), comparado ao grupo WkyC ($100 \pm 7,88$ % do controle).

Não encontramos diferença na proteína GATA4 (Fig. 13.H) (fator de transcrição GATA-4) normalizada por GAPDH, em ambos os grupos experimentais.

Alguns estudos observaram que os níveis de PI3K na hipertensão arterial estavam reduzidos em animais SHR sedentários. Neste sentido, os mesmos estudos mostraram que a p-AKT também estava reduzida nesses animais (HUANG et al., 2012; LIN et al., 2019; MIYACHI et al., 2009). Em contrapartida, um estudo encontrou a expressão proteína de AKT total aumentada nos animais SHR sedentários e a expressão da proteína AKT fosforilada não apresentou diferença (LIBONATI et al., 2011). Em nossos dados, não encontramos diferenças na expressão da PI3K total nos grupos avaliados. Por outro lado, o grupo ShrC, apresentou uma expressão reduzida quando realizamos a razão p-AKT/AKT e o grupo ShrT apresentou um valor de expressão aumentado em comparação ao seu respectivo controle (ShrC). Recentemente, foi demonstrado que várias quinases fosforilam 4EBP1 dependente ou independente de mTOR, indicando que mTOR pode não ser a única quinase que fosforila 4E-BP1, desafiando as cascatas convencionais de mTOR/4E-BP1. Vários candidatos foram

recentemente sugeridos como responsáveis pela fosforilação de 4E-BP1, tal como a MAPK (p38 e ERK) que pode regular a proteína 4EBP1 em resposta a vários estresses celulares, como infecção viral, choque osmótico, irradiação UV e apoptose mediada por TNF- α (QIN; JIANG; ZHANG, 2016). Neste sentido, um aumento de TNF- α e IL-6 como observamos em nossos dados, podem regular 4EBP1 que por sua vez, pode contribuir para uma redução na síntese de proteínas e atrofia observada em nossos dados. Em relação a proteína p-p70S6k, nós observamos um aumento em sua expressão nos grupos portadores de tumor (WkyT e ShrT). Um estudo utilizando o modelo de tumor N-Metil-N-nitrosourea (MNU), encontrou a proteína p-p70S6k aumentada no coração dos animais portadores da doença levando a um aumento de fibrose cardíaca (PADRÃO et al., 2015).



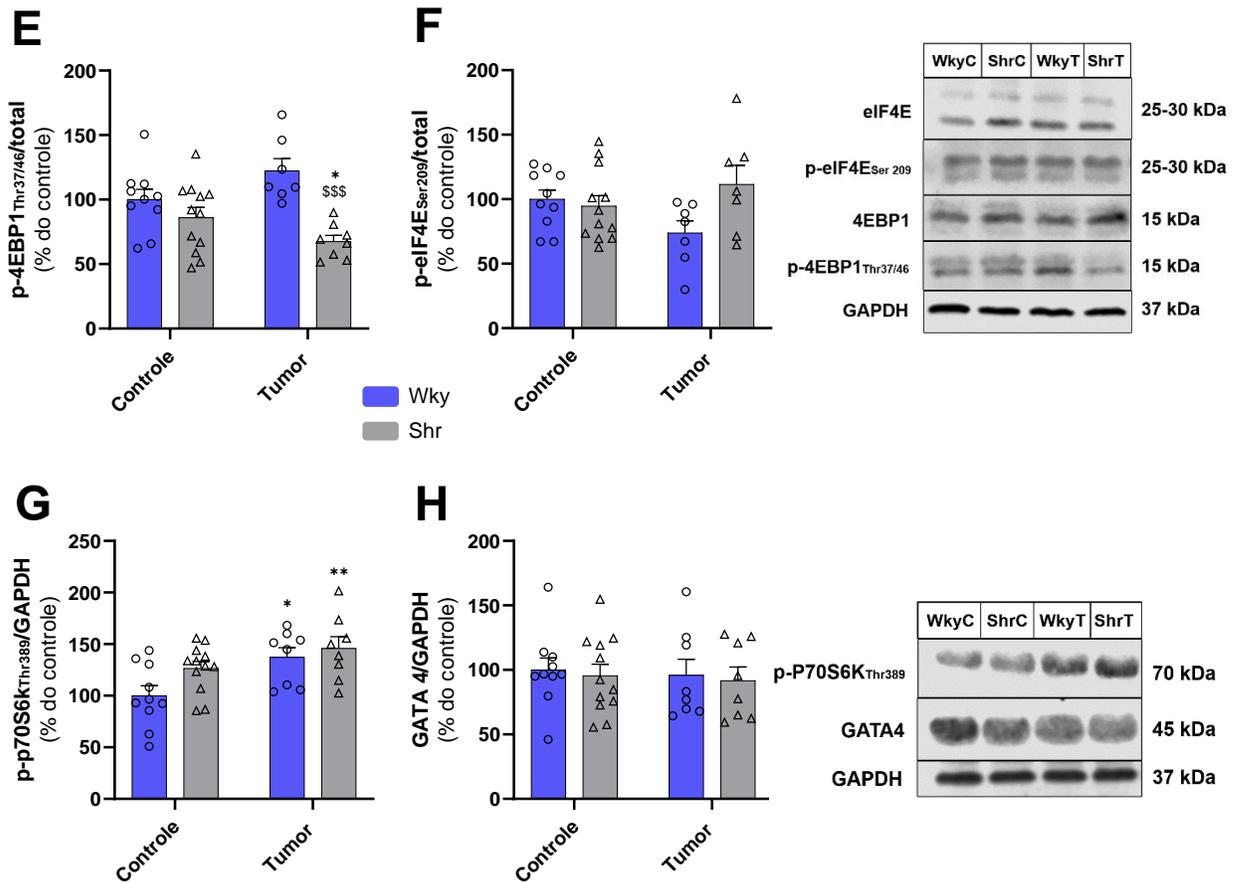


Figura 13. Análises de síntese e degradação proteica cardíaca

As proteínas totais foram normalizadas pelo GAPDH. Os resultados da expressão proteica foram expressos em porcentagem do controle (% do controle) para as proteínas: PI3K, AKT total e fosforilada, FoxO1, GS3K total e fosforilada, 4EBP1 total e fosforilada, eIF4E total e fosforilada, p-70 total e fosforilada e GATA4. Grupos: WkyC, indica Wistar Kyoto Controle (n = 10); WkyT, Wistar Kyoto Controle Tumor (n = 8); ShrC, Shr Controle (n = 12) e ShrT Tumor (n = 8). Os resultados são expressos como média ± EPM. Análise estatística: *Two-way* ANOVA, teste *post hoc* de Tukey. Diferença significativa vs. *WkyC, p < 0,05; **WkyC, p < 0,01; ****WkyC, p < 0,0001; ††ShrC, p < 0,0001.

5.9 Análises de proteínas de sobrevivência e apoptose celular cardíaca

Quando analisamos a expressão das proteínas envolvidas na sobrevivência e apoptose celular cardíaca, nós não encontramos diferenças significativas nas proteínas:

BAD (Fig.14.A), BCL-2 (Fig.14.B) (Linfoma de células B2) e BCL-x (Fig.12.C) (Linfoma de células B-extragrande).

Estudos avaliando a apoptose em modelo hipertensão arterial utilizando animais SHR mostraram que a expressão proteica cardíaca de BAD estava aumentada em animais portadores da doença sedentários, tendo assim um perfil de apoptose aumentado na HA (HUANG et al., 2012; LEE et al., 2006; LIN et al., 2019).

Em relação a via de sobrevivência celular, os estudos apontam uma redução de BCL-2 e BCL-x no coração de animais Shr (LAJOIE; CALDERONE; BÉLIVEAU, 2004; LEE et al., 2006; LIN et al., 2019).

Por outro lado, em animais portadores de tumor a expressão proteína de BAD é aumentada devido ao aumento da apoptose, que mostrou ser significativamente maior em animais portadores caquéticos portadores de tumor (BORA et al., 2022; MANNE et al., 2013).

Em nossos dados, não observamos diferenças nas proteínas relacionadas à sobrevivência e apoptose celular, tanto para os animais Shr, quanto para os animais Wky, bem como a associação HA e câncer mostrou não gerar influência na expressão destas proteínas.

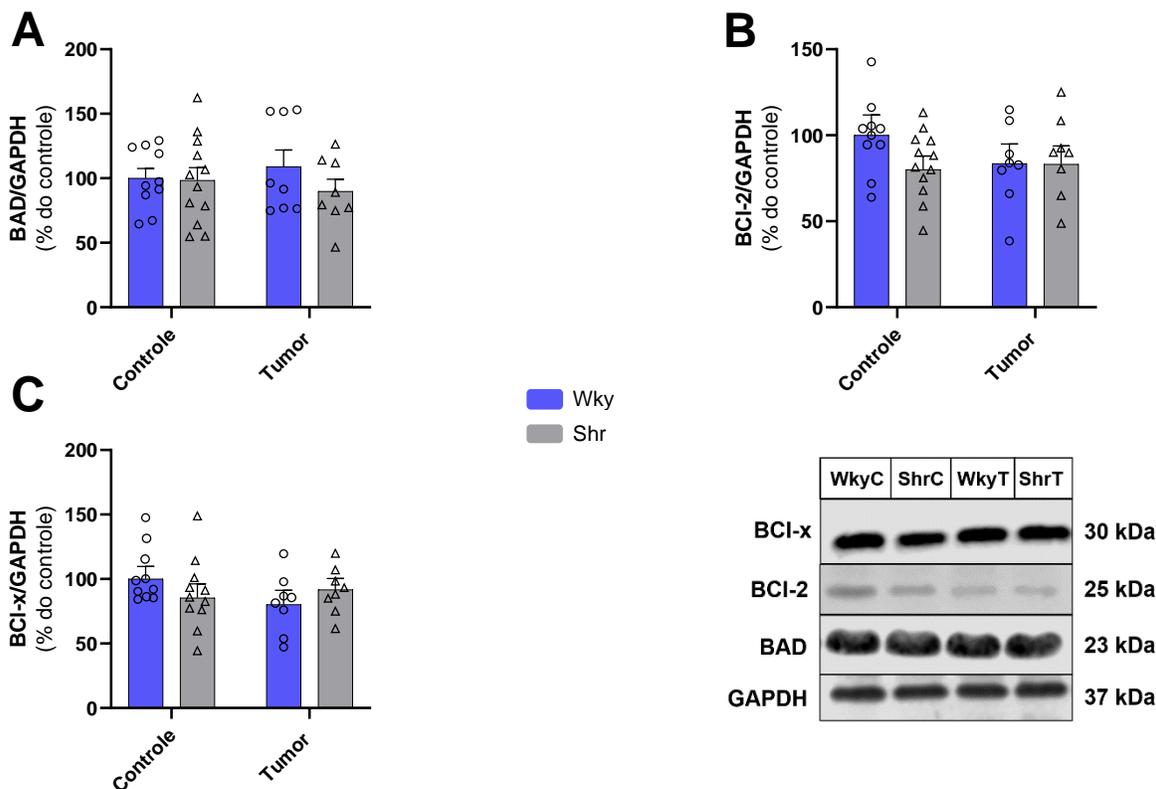


Figura 14. Análises de proteínas de sobrevivência e apoptose celular cardíaca

As proteínas totais foram normalizadas pelo GAPDH. Os resultados da expressão proteica foram expressos em porcentagem do controle (% do controle) para as proteínas: BAD, BCL-2 e BCL-x. Grupos: WkyC, indica Wistar Kyoto Controle (n = 12); WkyT, Wistar Kyoto Controle Tumor (n = 11); ShrC, Shr Controle (n = 12) e ShrT Tumor (n = 9). Os resultados são expressos como média \pm EPM. Análise estatística: *Two-way* ANOVA, teste *post hoc* de Tukey.

5.10 Família do microRNA-208a cardíaco e circulante na progressão tumoral

Como normalizador dos microRNAs cardíacos, utilizamos o U6 por não ter diferenças entre os grupos. O miR-208a cardíaco (Fig. 15.A) reduziu no grupo ShrT ($75 \pm 7,3$ % do controle; $p < 0,05$) comparado ao grupo WkyC ($100 \pm 6,2$ % do controle). De modo similar, foi observado uma redução do miR-208b (Fig. 15.B) e -499 (Fig. 15.C) cardíaco no ShrT (miR-208b, $41 \pm 2,9$ % do controle; $p < 0,0001$; miR-499, $57 \pm 7,1$ % do controle; $p < 0,01$) comparado ao grupo WkyC (miR-208b, $100 \pm 9,1$ % do controle; miR-499, $100 \pm 9,9$ % do controle).

Para a análise do miRNA circulante, utilizamos o miR-39 (Fig. 15.D) como normalizador. O miR-208a circulante (Fig. 15.E) estava aumentado no grupo WkyT ($213 \pm 15,5$ % do controle; $p < 0,001$) comparado ao grupo WkyC ($100 \pm 12,9$ % do controle). O grupo ShrT ($221 \pm 27,1$ % do controle; $p < 0,001$) estava com sua expressão aumentada comparada ao grupo WkyC ($100 \pm 12,9$ % do controle), ainda observamos um aumento do miR-208a no grupo ShrT ($221 \pm 27,1$ % do controle; $p < 0,001$) comparado ao grupo ShrC ($91 \pm 20,5$ % do controle).

O miRNA-208 é amplamente estudado no contexto das doenças cardiovasculares, seus níveis aumentados são relacionados à hipertrofia cardíaca e sua família é composta pelos miRNAs -208a, -208b e 499 (ZHAO; WANG; SUN, 2020). Um estudo mostrou que a expressão elevada do miRNA-208a estava associada a uma hipertrofia cardíaca aumentada (HUANG et al., 2015). De forma interessante, encontramos em nosso estudo uma expressão reduzida do miRNA-208a no grupo associação HA e câncer, bem como encontramos uma atrofia cardíaca, vista pelo peso de VE (Fig. 6.A) e redução da área de secção transversa (Fig. 6.N) no grupo ShrT. Em uma recente revisão os pesquisadores mostraram múltiplos fatores que influenciam o

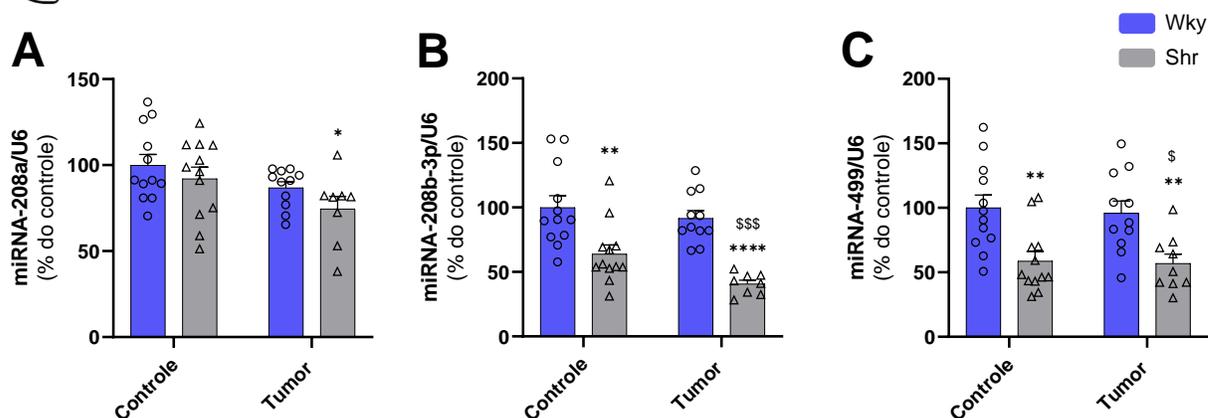
crescimento tumoral, caquexia e IC, foi evidenciado a participação de citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e TNF- α , por outro lado, a participação de citocinas não inflamatórias como a miostatina por exemplo, foi descrita por poder ser secretada do coração e influenciar na atrofia cardíaca. Também os pesquisadores mostraram a participação de miRNAs como miRNA-133, -145 e -208 (FINKE et al., 2021). Neste sentido, nossos dados mostraram uma redução do miRNA-208 na associação HA e câncer tanto assim como alvo a miostatina que poderia contribuir para a atrofia encontrada na associação HA e câncer. Em relação ao miRNA-208b e -499 encontramos uma redução em ambos os grupos portadores de HA, mostrando assim que a associação das doenças não gera uma influência adicional na expressão destes microRNAs.

Atualmente, diversos estudos estão destacando que o miRNA-208a pode apresentar uma participação no desenvolvimento e progressão do câncer (CUI et al., 2018; LIU et al., 2014; YU et al., 2015). Há também evidências da presença do miRNA-208a no plasma de ratos com lesão do miocárdio (JI et al., 2009).

Observamos em nossos resultados, um aumento na expressão do miRNA-208a na circulação de animais tanto portadores de tumor quanto na associação HA e câncer, sugerindo que este miRNA-208a poderia estar envolvido nesta no crescimento tumoral destes animais, embora nenhum efeito adicional tenha sido observado na associação das doenças.



miRNAs cardíacos



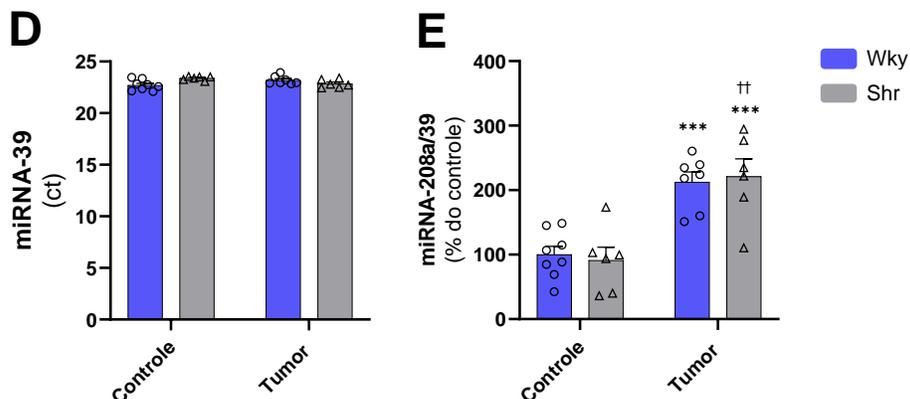


Figura 15. Expressão de miRNAs cardíaco e circulante.

O U6 foi utilizado para normalizar os miRNAs cardíacos e o miR-39 foi utilizado para normalizar o miRNA circulante. Os resultados da expressão dos miRNAs foram expressos em porcentagem do controle (% do controle) para os miRNAs cardíacos: -208a (A), -208b (B) e -499 (C) e para o miRNA circulante: -208a (E). Grupos: WkyC, indica Wistar Kyoto Controle (n = 12); WkyT, Wistar Kyoto Controle Tumor (n = 11); ShrC, Shr Controle (n = 12) e ShrT Tumor (n = 9). Os resultados são expressos como média ± EPM. Análise estatística: *Two-way* ANOVA, teste *post hoc* de Tukey. Diferença significativa vs. *WkyC, p < 0,05; **WkyC, p < 0,01; ****WkyC, p < 0,0001; ††ShrC, p < 0,001; \$WkyT p < 0,05; \$\$\$WkyT p < 0,001.

No sumario dos resultados (Fig. 16) obtidos na primeira etapa do estudo, observamos que a associação HA e câncer gera um aumento de genes pró-inflamatórios como TNF- α e IL-6, desarranjo de proteínas sarcoméricas, redução da síntese proteica via 4EBP1 e uma redução do miRNA-208 no coração, resultando assim em atrofia cardíaca, aumento de fibrose e disfunção do VE, por outro lado, também observamos um aumento do miRNA-208a circulante. Juntos estes resultados destacam os efeitos negativos da relação bidirecional entre HA e CA, promovendo incapacidade física, maior crescimento tumoral, caquexia e dano cardíaco.

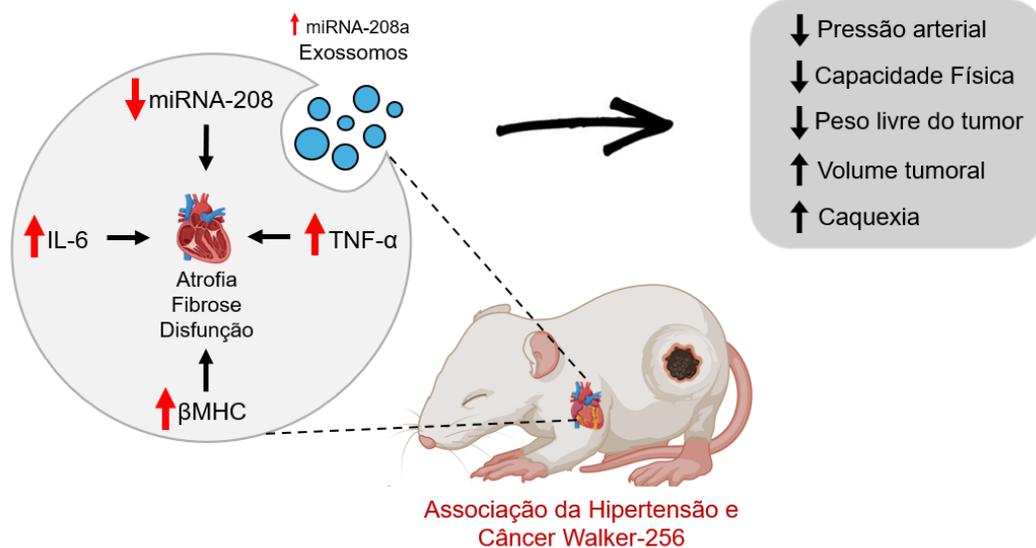


Figura 16. Efeito da associação da HA e câncer Walker-256 sobre o fenótipo cardíaco e incapacidade física.

6. Resultados da segunda etapa do estudo

Agora iremos discutir sobre os resultados da segunda etapa do estudo, que teve como objetivo entender o efeito do treinamento físico aeróbio na relação bidirecional da HA e câncer.

6.1 Modelo de caquexia no tumor Walker-256 associado a hipertensão arterial e o efeito do treinamento físico aeróbio

O peso corporal (Fig. 17.A) dos animais WkyT e ShrT não apresentaram diferença, como observado no primeiro lote experimental. No entanto, houve uma redução de peso corporal nos grupos treinados WkyT-Ex ($261 \pm 8,44$ g; $p < 0,001$) e ShrT-Ex ($270 \pm 3,89$ g; $p < 0,001$) ambos comparados ao grupo WkyC ($294 \pm 2,86$ g).

Quando analisamos o peso livre do tumor (Fig. 17.B) encontramos uma redução de peso no grupo ShrT ($240 \pm 4,40$ g; $p < 0,05$) comparado ao grupo WkyT ($261 \pm 3,55$ g). O peso livre de tumor estava reduzido também no grupo ShrT-Ex ($247 \pm 3,59$ g; $p < 0,05$) comparado ao grupo WkyT ($261 \pm 3,55$ g).

A progressão do crescimento tumoral (Fig. 17.C) estava maior no grupo ShrT ($24,5 \pm 1,37 \text{ cm}^3$; $p < 0,001$) no dia 01/dez, comparado ao grupo ShrT-Ex ($13,5 \pm 1,45 \text{ cm}^3$). No dia 03/dez a progressão do tumor estava maior no grupo ShrT ($32,3 \pm 2,21 \text{ cm}^3$; $p < 0,05$) comparado ao grupo WkyT ($22,4 \pm 2,58 \text{ cm}^3$) e no grupo ShrT ($32,3 \pm 2,21 \text{ cm}^3$; $p < 0,0001$) comparado ao grupo ShrT-Ex ($16 \pm 1,71 \text{ cm}^3$). Quando analisamos a progressão no dia 05/dez encontramos um aumento no grupo ShrT ($46 \pm 3,86 \text{ cm}^3$; $p < 0,0001$), comparado ao grupo WkyT ($29,8 \pm 4 \text{ cm}^3$). Ainda, encontramos um maior crescimento tumoral no grupo WkyT ($29,8 \pm 4 \text{ cm}^3$; $p < 0,001$) comparado ao grupo WkyT-Ex ($20,4 \pm 1,8 \text{ cm}^3$). Observamos também um crescimento tumoral maior no grupo ShrT ($46 \pm 3,86 \text{ cm}^3$; $p < 0,0001$) comparado ao grupo ShrT-Ex ($19 \pm 1,73 \text{ cm}^3$).

Corroborando com a análise de crescimento tumoral, o peso do tumor (Fig. 17.D) estava aumentado no grupo ShrT ($1,19 \pm 0,08 \text{ g/mm}$; $p < 0,01$), comparado ao grupo WkyT ($0,95 \pm 0,05 \text{ g/mm}$). Encontramos um peso tumoral menor no grupo WkyT-Ex ($0,47 \pm 0,06 \text{ g/mm}$; $p < 0,01$) quando comparado ao grupo WkyT ($0,95 \pm 0,05 \text{ g/mm}$). Também encontramos uma redução no grupo ShrT-Ex ($0,61 \pm 0,05 \text{ g/mm}$; $p < 0,0001$), comparado ao grupo ShrT ($1,19 \pm 0,08 \text{ g/mm}$).

O músculo sóleo (Fig. 17.E) apresentou um aumento no peso no grupo ShrT-Ex ($0,0036 \pm 0,00006 \text{ g/mm}$; $p < 0,05$) comparado ao grupo ShrT ($0,0032 \pm 0,00008 \text{ g/mm}$).

Na Figura 17. F avaliamos o peso do músculo plantar, observamos uma redução no grupo ShrT ($0,0065 \pm 0,0002 \text{ g/mm}$; $p < 0,001$) comparado ao grupo WkyT ($0,008 \pm 0,0002 \text{ g/mm}$). Esta redução foi mantida no grupo ShrT-Ex ($0,0066 \pm 0,0001 \text{ g/mm}$; $p < 0,01$), sem alterar o peso no WkyT-Ex ($0,008 \pm 0,0003 \text{ g/mm}$).

O peso do gastrocnêmio (Fig. 17.G) estava reduzido no grupo ShrT ($0,029 \pm 0,0007 \text{ g/mm}$; $p < 0,01$) comparado ao grupo WkyT ($0,035 \pm 0,001 \text{ g/mm}$). Esta redução foi atenuada no grupo ShrT-Ex comparado ao grupo WkyT indo em direção aos valores do controle.

Acompanhado da redução da massa muscular, a gordura retroperitoneal (Fig. 17.H) também foi reduzida nos grupos ShrT ($0,065 \pm 0,005 \text{ g/mm}$; $p < 0,01$) comparado ao grupo WkyT ($0,08 \pm 0,006 \text{ g/mm}$). O TFA reduziu o peso de gordura retroperitoneal no

grupo WkyT-Ex ($0,05 \pm 0,006$ g/mm; $p < 0,01$) comparado ao WkyT, sem alterar o percentual de gordura no grupo ShrT-Ex ($0,06 \pm 0,002$ g/mm; $p < 0,01$). De modo similar, a gordura epididimal (Fig. 17.I) foi reduzida nos grupos ShrT ($0,06 \pm 0,006$ g/mm; $p < 0,05$) e WkyT-Ex ($0,05 \pm 0,005$ g/mm; $p < 0,01$), ambos comparados ao grupo WkyT ($0,07 \pm 0,006$ g/mm); entretanto o TFA preveniu a perda acentuada de gordura epididimal no grupo ShrT-Ex comparado ao grupo Wky-T.

Em relação ao peso do baço (Fig. 17.J), foi encontrado uma redução no peso dos grupos ShrT ($0,03 \pm 0,002$ g/mm; $p < 0,001$) e WkyT ($0,03 \pm 0,002$ g/mm; $p < 0,001$) comparados ao grupo WkyT ($0,06 \pm 0,006$ g/mm), similar ao primeiro estudo. O TFA promoveu uma redução nesta esplenomegalia com a redução no peso do baço no grupo ShrT-Ex ($0,02 \pm 0,001$ g/mm; $p < 0,0001$) comparado ao grupo WkyT ($0,06 \pm 0,006$ g/mm). Ainda, uma redução no peso do baço foi observada no grupo ShrT-Ex ($0,02 \pm 0,001$ g/mm; $p < 0,05$), quando comparado ao grupo ShrT ($0,03 \pm 0,006$ g/mm).

Como observamos nos resultados de padronização do primeiro lote experimental, nós não encontramos diferenças em relação ao peso dos animais sedentários, tanto no grupo portador de câncer (WkyT) quanto no grupo associação HA e câncer (ShrT), em que a literatura mostra que o peso total, muitas vezes não se altera durante o protocolo (GERALDELLI et al., 2020; MOREIRA et al., 2018, 2019). Por outro lado, animais SHR que passaram por um protocolo de treinamento aeróbio apresentaram uma redução de peso corporal ao final do treinamento (ZHANG et al., 2017). Em um estudo utilizando o treinamento de resistência no modelo de tumor Walker-256, foi observada uma redução do peso corporal no grupo treinado após o protocolo de treinamento (DEMINICE et al., 2016). Em nossos resultados, encontramos uma redução no peso total dos animais treinados WkyT-Ex e ShrT-Ex comparados ao grupo controle. No entanto, quando avaliamos o peso livre do tumor, tivemos uma redução somente no grupo associação HA e câncer.

O grupo ShrT apresentou um maior crescimento tumoral e peso do tumor comparado aos demais grupos e o TFA foi capaz de promover uma atenuação do crescimento tumoral, visto em ambos os grupos treinados WkyT-Ex e ShrT-Ex, indicando assim um efeito protetor do TFA. Um estudo utilizando o treinamento físico em esteira

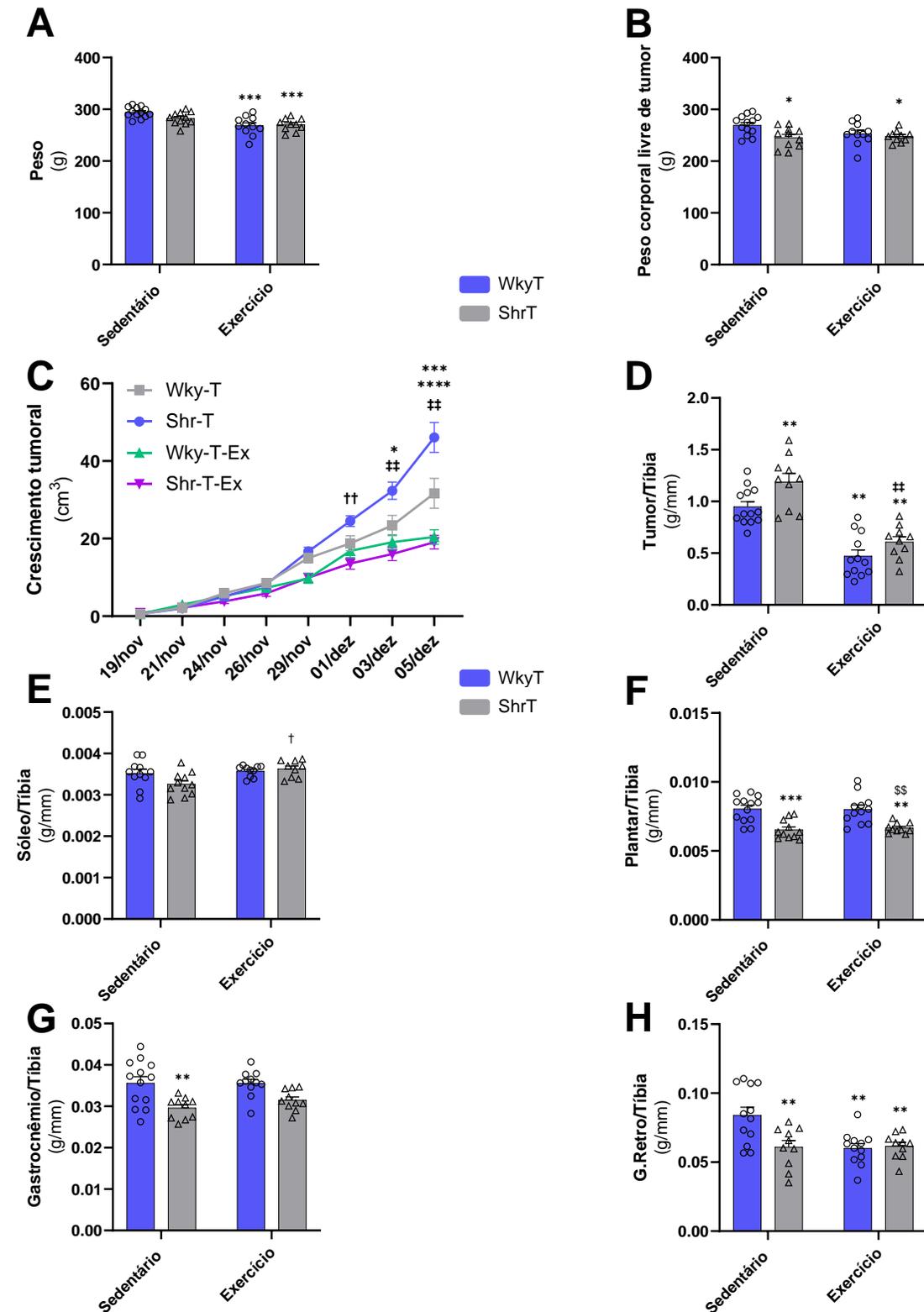
em animais portadores de tumor Walker-256, mostrou um menor peso do tumor nos animais que realizaram o protocolo de treinamento comparados aqueles que permaneceram sedentários (MOREIRA et al., 2018). Outro estudo realizado pelo mesmo grupo, mostrou que o TFA foi capaz de reduzir o crescimento do tumor em animais jovens e adultos, no entanto o treinamento gerou uma redução do tumor maior nos animais mais jovens (MOREIRA et al., 2019).

Em relação ao peso dos músculos, o tumor Walker-256 é conhecido por gerar caquexia nos animais portadores. Um estudo mostrou que os animais portadores do tumor tiveram uma redução do gastrocnêmio, no entanto o exercício não foi capaz de prevenir esta perda em animais mais velhos (145 dias de idade), porém, em animais mais jovens (105 dias idade) o treinamento foi capaz de prevenir a perda de músculo. Em relação ao músculo sóleo, os animais mais jovens não tiveram perda de massa muscular. Já os animais mais velhos tiveram uma perda de massa e o treinamento não foi capaz de preservar a musculatura (MOREIRA et al., 2019). De fato, em nossos dados encontramos que o TFA foi capaz de prevenir a perda de peso do músculo sóleo e gastrocnêmio no grupo ShrT-Ex, o que pode ser explicado por uma mudança no tipo de TFA utilizado na prevenção da caquexia muscular.

Ainda, observamos uma perda de tecido adiposo, no qual tivemos uma redução da gordura retroperitoneal nos grupos ShrT, WkyT-Ex e ShrT-Ex e de gordura epididimal nos grupos ShrT e WkyT-Ex. A literatura mostra que animais portadores do tumor Walker-256 apresentam perda de tecido adiposo e o treinamento não previne esta perda (MOREIRA et al., 2018, 2019). Os animais SHR também possuem um menor peso de adipócitos, quando comparados a animais normotensos (BORGHI et al., 2019, 2020).

Diversos tipos de câncer são conhecidos por gerar a esplenomegalia, que é caracterizada pelo crescimento anormal do baço (MCKENZIE et al., 2018). Um trabalho utilizando células de tumor de cólon 26 (CT26) e carcinoma pulmonar de Lewis (LLC), mostrou um aumento do baço nos animais portadores da doença, por outro lado, os animais que realizaram o TFA não tiveram este aumento no baço, sendo um efeito preventivo do treinamento (TOBIAS et al., 2023). Em nossos dados, encontramos uma

redução na massa do baço em ambos os grupos treinados, sendo efeito benéfico do TFA independentemente do tipo de câncer e modalidade empregada.



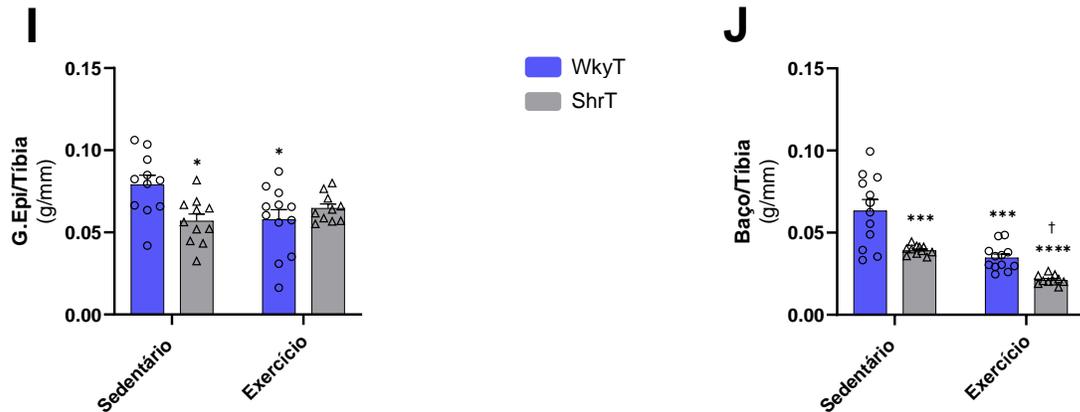


Figura 17. Efeitos do TFA na relação bidirecional da HA e câncer Walker-256 e redução dos efeitos da caquexia.

Os resultados de peso corporal (A) e peso livre de tumor (B) foram expressos em grama (g). O crescimento tumoral (C) foi avaliado em centímetros cúbicos (cm³). Os resultados de peso do tumor (D) e dos músculos sóleo (E), plantar (F) e gastrocnêmio (G) foram expressos em gramas (g) divididos pelo comprimento da tíbia (mm), para correção. Analisamos também a gordura retroperitoneal (G.Retro), gordura epididimal (G.Epi) e o baço, Figuras H, I e J. Grupos: WkyT, indica Wistar Kyoto Tumor (n = 13); WkyT-Ex, Wistar Kyoto Tumor Exercício (n = 12); ShrT, Shr Tumor (n = 11) e ShrT-Ex, Tumor Exercício (n = 10). Os resultados são expressos como média ± EPM. Análise estatística: Teste T e *Two-way* ANOVA, teste *post hoc* de Tukey. Diferença significativa vs. *WkyT, p < 0,05; **WkyT, p < 0,01; ***WkyT, p < 0,001; ****WkyT, p < 0,0001; †ShrT, p < 0,05; ††ShrT, p < 0,001; †††ShrT, p < 0,0001; \$\$WkyT-Ex p < 0,01.

6.2 Efeito do TFA sobre a capacidade física na relação bidirecional da HA e câncer

Não observamos diferenças no teste de tolerância ao esforço na avaliação pré-protocolo experimental tanto em relação à distância de teste (Fig. 18.A) quanto ao tempo de teste (Fig. 18.B). Por outro lado, quando analisamos os dados pós-protocolo experimental, observamos uma redução na tolerância ao esforço no grupo WkyT, tanto em relação à distância de teste (Fig. 18.A) (pós: 552 ± 55 m; p < 0,0001) quanto tempo de teste (Fig. 18.B) (pós: 27 ± 1 min; p < 0,0001) comparado aos resultados pré-protocolo experimental em relação a distância (pré: 962 ± 44 m) e tempo (pré: 39 ± 1 min), respectivamente. O grupo ShrT apresentou uma redução na distância (pós: 300 ± 29 m; p < 0,0001) e tempo de teste (pós: 20 ± 0,52 min; p < 0,0001) pós-protocolo experimental, comparado aos resultados pré-protocolo (pré: 956 ± 63 m) e tempo (pré: 38 ± 1 min).

Também encontramos uma redução para ambas as variáveis do grupo ShrT (pós: 300 ± 29 m; $p < 0,05$) e tempo de teste (pós: $20 \pm 0,52$ min; $p < 0,001$) comparado ao pós-teste do grupo WkyT (pós: 552 ± 55 m) e tempo (pós: 27 ± 1 min). O grupo WkyT-Ex não apresentou diferença do seu pré-teste para o seu pós-teste, sendo um efeito esperado do TFA em atenuar os efeitos negativos do câncer na capacidade física dos animais. O grupo ShrT-Ex apresentou uma maior distância percorrida (pós: 822 ± 48 m; $p < 0,05$) e tempo (pós: 35 ± 1 min; $p < 0,0001$) no teste pós-protocolo comparado ao pós-teste do grupo WkyT distância pós: 552 ± 55 m e tempo pós: 27 ± 1 min. Ainda, o grupo ShrT-Ex apresentou uma maior distância percorrida (pós: 822 ± 48 m; $p < 0,0001$) e tempo (pós: 35 ± 1 min; $p < 0,0001$) no teste pós-protocolo comparado ao grupo ShrT pós-protocolo distância pós: 300 ± 29 m e tempo pós: $20 \pm 0,52$ min.

Ao realizarmos a análise do *grip strenght* (Fig. 18.C), observamos uma redução de força no grupo ShrT (1580 ± 68 g; $p < 0,01$), comparado ao grupo WkyT (1810 ± 23 g). O grupo ShrT-Ex, por sua vez, apresentou um aumento de força no teste (1926 ± 28 g; $p < 0,0001$), comparado ao grupo ShrT (1580 ± 68 g).

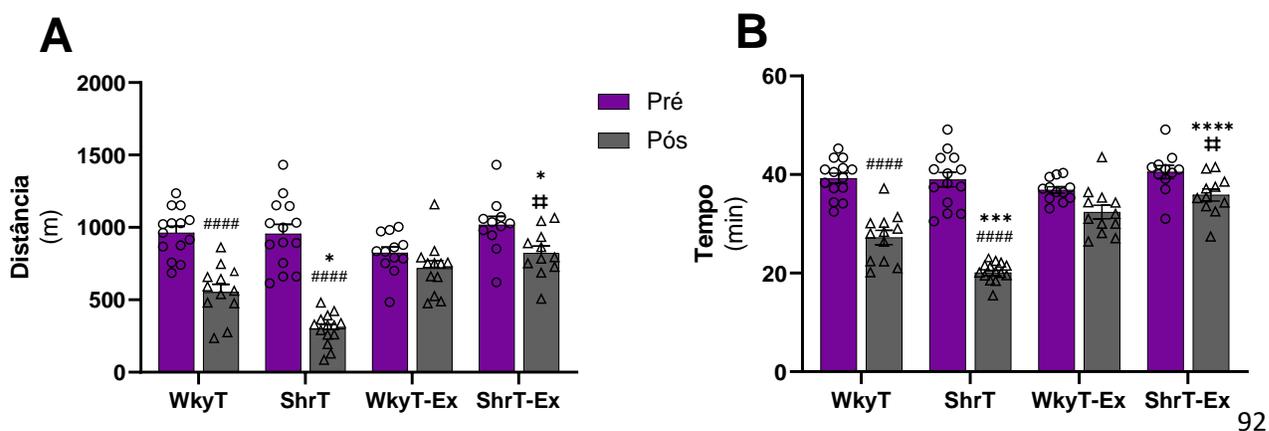
Realizamos também a análise da Citrato Sintase (Fig. 18.D) no músculo sóleo. O grupo ShrT (38 ± 3 nmol. min^{-1} . mg de proteína $^{-1}$; $p < 0,05$) apresentou uma redução, comparado ao grupo WkyT (50 ± 2 nmol. min^{-1} . mg de proteína $^{-1}$). Por outro lado, houve um aumento da Citrato Sintase nos grupos WkyT-Ex (64 ± 3 nmol. min^{-1} . mg de proteína $^{-1}$; $p < 0,01$) e ShrT-Ex (67 ± 3 nmol. min^{-1} . mg de proteína $^{-1}$; $p < 0,01$), comparado ao grupo WkyT (50 ± 2 nmol. min^{-1} . mg de proteína $^{-1}$). Também observamos um aumento no grupo ShrT-Ex (67 ± 3 nmol. min^{-1} . mg de proteína $^{-1}$; $p < 0,0001$), comparado ao grupo ShrT (38 ± 3 nmol. min^{-1} . mg de proteína $^{-1}$). Estes dados em conjunto mostram que o TFA melhorou a capacidade física e força muscular preservando o metabolismo oxidativo aeróbio.

Não encontramos diferença em nossos resultados de teste de tolerância ao esforço pré-protocolo experimental. Um estudo utilizando o modelo Shr mostrou, por outro lado, uma diferença nos animais Shr já no primeiro teste de tolerância, no qual os animais Shr estavam mais tolerantes ao esforço e o TFA aumentou mais essa tolerância ao final do protocolo experimental, mostrando assim um efeito benéfico do TFA na

capacidade física dos animais (DE ANDRADE et al., 2015). O tumor Walker-256 por outro lado, em seu desenvolvimento e progressão gera uma intolerância aos esforços (ALVES et al., 2020; MOREIRA et al., 2018). Em nossos resultados observamos uma redução da tolerância de esforço nos grupos portadores de tumor sedentários (WkyT e ShrT), no entanto essa intolerância foi mais acentuada no grupo associação HA e câncer. O TFA capaz de prevenir a intolerância ao esforço, e que ambos os grupos treinados tiveram um melhor desempenho no teste.

Em nossos resultados do primeiro lote experimental, encontramos uma redução de força no teste *grip strength* somente no grupo associação HA e câncer. O TFA mostrou prevenir a redução de força nos animais ShT-Ex. Um estudo utilizando treinamento de resistência mostrou que os animais Shr que foram expostos ao treinamento tiveram um aumento de força ao final do protocolo comparado ao grupo controle (NEVES et al., 2016). Sendo assim, nossos dados mostraram um efeito benéfico do TFA, prevenindo a redução da força dos animais que foram expostos a associação HA e câncer.

Por fim, realizamos a avaliação da enzima citrato sintase, por ser um indicativo de otimização do metabolismo aeróbio, sendo assim, utilizamos este parâmetro para comprovarmos a eficiência do TFA (VIGELSØ; ANDERSEN; DELA, 2014). Encontramos aumento da citrato sintase no músculo sóleo em ambos os grupos treinados quando comparado aos grupos que permaneceram sedentários, sugerindo que na associação da HA e câncer há uma mudança de perfil metabólico com aumento do metabolismo glicolítico acompanhado de maior perda de massa muscular e o TFA previne estas alterações com melhora do metabolismo oxidativo e manutenção de massa e força muscular.



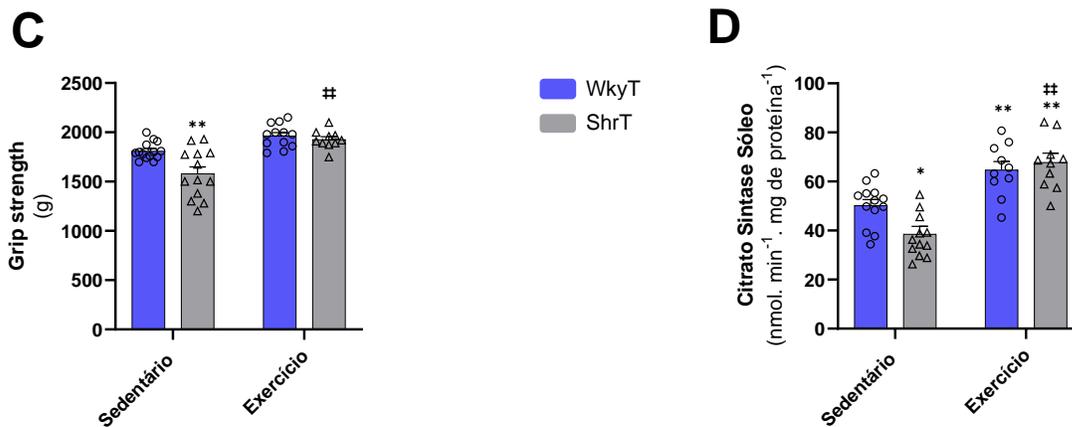


Figura 18. Efeito do TFA sobre a capacidade funcional na associação entre HA e câncer

Os resultados de distância foram expressos em metros (m) e os resultados de tempo de teste foram expressos em minutos (min). Em relação ao *grip strength* os resultados foram expressos em gramas (g). A Citrato Sintase foi expressa em valores de nmol. min⁻¹. mg de proteína⁻¹. Grupos: WkyT, indica Wistar Kyoto Tumor (n = 14); WkyT-Ex, Wistar Kyoto Tumor Exercício (n = 12); ShrT, Shr Tumor (n = 14) e ShrT-Ex, Tumor Exercício (n = 11). Os resultados são expressos como média ± EPM. Análise estatística: Two-way ANOVA, teste *post hoc* de Tukey. Diferença significativa vs. # indica a diferença entre pré-teste e pós-teste. (####) p < 0,0001. *WkyT, p < 0,05; **WkyT, p < 0,01; ***WkyT, p < 0,001; ****WkyT, p < 0,0001; ††ShrT, p < 0,0001.

6.3 Efeito do TFA nas medidas cardiovasculares

Quando medimos a PAS (Fig.19.A) pré-protocolo experimental, não encontramos diferença entre os grupos WkyT e WkyT-Ex. Como esperado, o grupo ShrT (173 ± 2 mmHg; p < 0,0001) mostrou um aumento na PAS em comparação ao grupo WkyT (145 ± 3 mmHg). O grupo ShrT-Ex (170 ± 3 mmHg; p < 0,0001) mostrou um aumento na PAS pré em comparação ao grupo WkyT-Ex (146 ± 3 mmHg).

A PAS do grupo ShrT pós (153 ± 3 mmHg; p < 0,0001) estava reduzida quando comparada ao grupo ShrT pré (173 ± 2 mmHg). O grupo WkyT-Ex apresentou uma PAS reduzida pós-protocolo (128 ± 2 mmHg; p < 0,001) comparado ao seu resultado pré-protocolo experimental (146 ± 3 mmHg). Também observamos uma redução na PAS pós-protocolo no grupo WkyT-Ex (128 ± 2 mmHg; p < 0,01) comparado ao grupo WkyT pós-protocolo (146 ± 2 mmHg).

Encontramos a PAS no grupo ShrT-Ex reduzida pós-protocolo (146 ± 4 mmHg; $p < 0,001$) comparada a seu resultado pré-protocolo (170 ± 3 mmHg). No entanto, uma PAS aumentada foi observada no pós-protocolo do grupo ShrT-Ex (146 ± 4 mmHg; $p < 0,01$) comparada ao resultado pós-protocolo do grupo WkyT-Ex (128 ± 2 mmHg).

No grupo ShrT (377 ± 11 bpm; $p < 0,0001$), a FC estava maior em comparação ao grupo WkyT (306 ± 11 bpm). O grupo ShrT-Ex (355 ± 5 bpm; $p < 0,01$) apresentou uma FC maior em comparação ao grupo WkyT (306 ± 11 bpm). Esta diferença na FC também foi observada quando comparamos o grupo ShrT-Ex (355 ± 5 bpm; $p < 0,05$) com o grupo WkyT-Ex (317 ± 6 bpm) (Fig. 19.B).

Como esperado, encontramos um aumento da PAS pré-teste nos animais Shr e um aumento da FC nos animais hipertensos que o treinamento não foi capaz de prevenir. Um estudo avaliando o mesmo modelo animal, mostrou um aumento da PAS nos animais Shr no pré-protocolo experimental. No entanto, após os animais passarem pelo TFA, os pesquisadores observaram uma redução da PAS e FC nos animais Shr (DE ANDRADE et al., 2015). Em nossos resultados encontramos uma redução da PAS nos animais ShrT, resultado esse associado a um efeito negativo da associação HA e câncer. Como visto em um estudo utilizando animais com tumor C26, os animais tiveram uma redução da PAS 18 dias após o inóculo das células e apresentaram uma disfunção miocárdica (STEVENS et al., 2015). Também encontramos em nossos resultados uma redução da PAS nos animais que foram expostos ao TFA, mas não observamos alterações na FC dos animais.

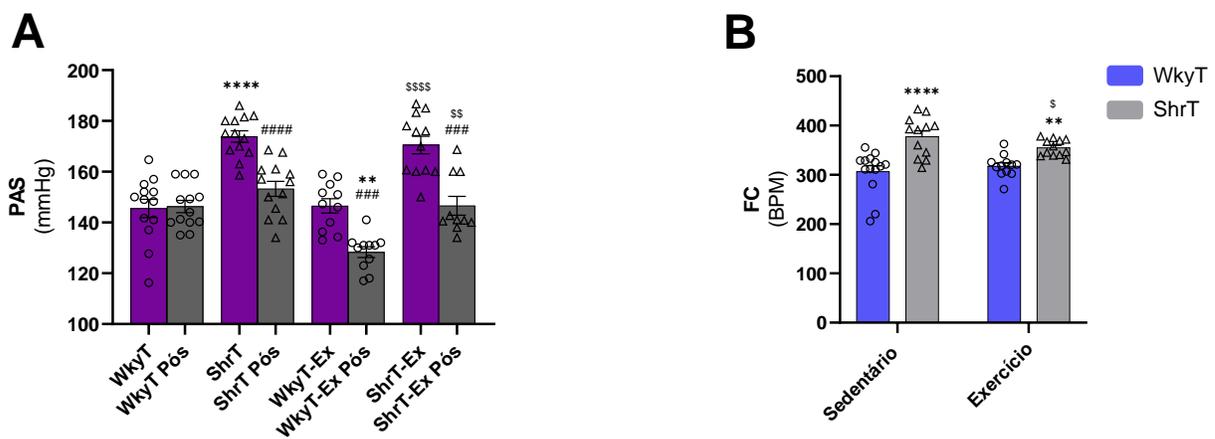


Figura 19. Medidas cardiovasculares na associação da HA e câncer e TFA.

Pressão arterial sistólica (PAS), foi expressa em milímetros de mercúrio (mmHg). A frequência cardíaca (FC) foi expressa em batimentos por minuto (bpm). Grupos: WkyT, indica Wistar Kyoto Tumor (n = 13); WkyT-Ex, Wistar Kyoto Tumor Exercício (n = 11); ShrT, Shr Tumor (n = 13) e ShrT-Ex, Tumor Exercício (n = 12). Os resultados são expressos como média \pm EPM. Análise estatística: *Two-way ANOVA*, teste *post hoc* de Tukey. Diferença significativa vs. ****WkyT, $p < 0,0001$; \$WkyT-Ex, $p < 0,05$.

6.4 Efeito do TFA sobre a função cardíaca na relação bidirecional da HA e câncer

Não encontramos diferenças nas medidas de fração de ejeção (Fig. 20.A) e fração de encurtamento (Fig. 20.B). Também não encontramos diferença no Tempo de Contração Isovolumétrico (IVCT) (Fig. 20.C).

O Tempo de Relaxamento Isovolumétrico (IVRT) (Fig. 20.D) estava aumentado no grupo ShrT ($19 \pm 0,6$ ms; $p < 0,05$) comparado ao grupo WkyT ($16 \pm 1,2$ ms), o que foi preservado pelo TFA no grupo ShrT-Ex quando comparado ao grupo WkyT. A desaceleração da onda E (MV Decel) (Fig. 20.E) estava reduzida no grupo ShrT ($21 \pm 1,9$ ms; $p < 0,05$) comparado ao grupo WkyT ($34 \pm 3,2$ ms). Por outro lado, o TFA preveniu a redução da MV Decel no grupo ShrT-Ex comparado ao grupo WkyT. A MV E/A (Fig. 20.F) estava reduzida no grupo ShrT-Ex ($1,5 \pm 0,7$; $p < 0,05$) comparada ao grupo WkyT-Ex ($2,3 \pm 0,1$).

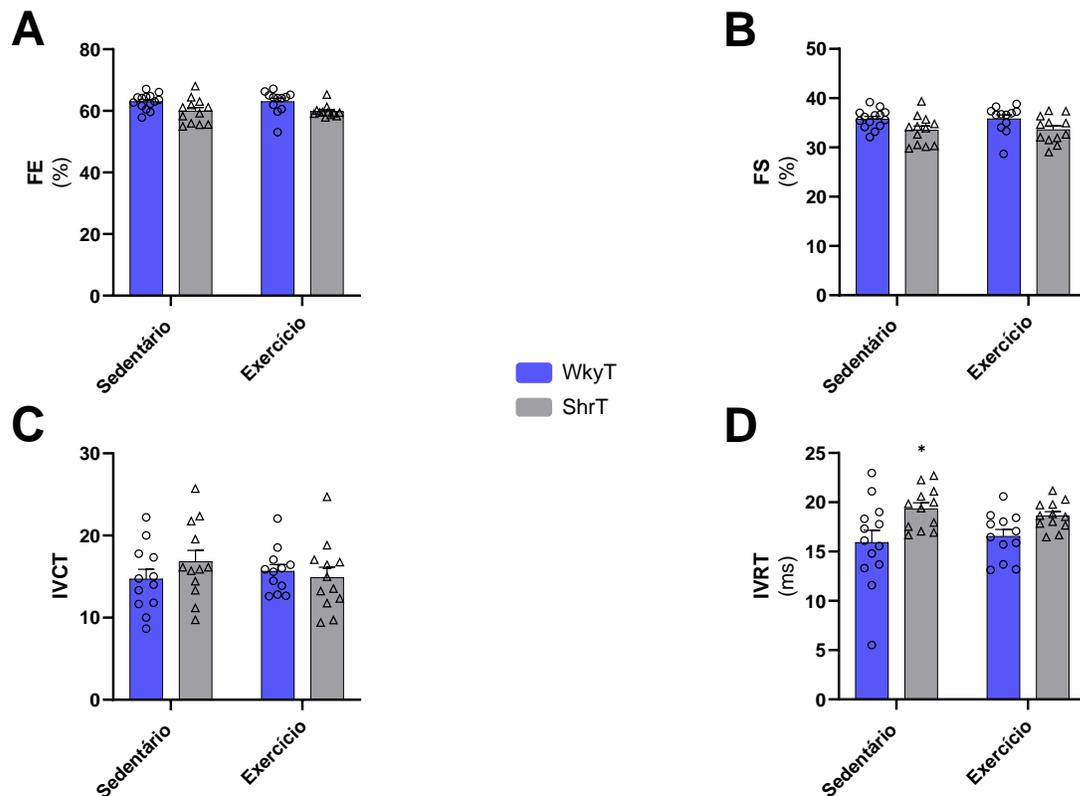
O índice de performance miocárdica (TEI) (Fig. 20.G) estava aumentado somente no grupo ShrT ($0,57 \pm 0,04$; $p < 0,05$) comparado ao grupo WkyT ($0,42 \pm 0,03$). Entretanto, o TFA preveniu o aumento da TEI no grupo ShrT-Ex comparado ao grupo WkyT, indicando uma melhora da função cardíaca global induzida pelo TFA na associação HA e câncer.

Em relação à função cardíaca dos animais Shr, alguns estudos não mostraram alterações de FE e FS (QUIROGA et al., 2020; REZENDE et al., 2021). Por outro lado, um estudo utilizando animais Shr já com insuficiência cardíaca, os pesquisadores encontraram uma FS reduzida nos animais insuficientes e o TFA preveniu este aumento (MIYACHI et al., 2009).

Um trabalho utilizando o treinamento *high-intensity interval training* (HIIT) em animais Shr não encontrou diferença em relação ao IVRT e a razão E/A nos animais sedentários e o treinamento não alterou este parâmetro (ENGEL et al., 2022).

O TEI é um índice de desempenho do miocárdio, ele é considerado um parâmetro confiável para a função ventricular esquerda global (SHINGU et al., 2010). Em um estudo que teve como objetivo entender o papel do treinamento combinado na rigidez arterial e pressão arterial em animais Shr, os pesquisadores mostraram no início do protocolo experimental que o TEI não estava alterado em animais Shr e o exercício não promoveu diferenças neste índice (TARDELLI et al., 2022).

Em nossos resultados, não encontramos diferenças na FE e FS, corroborando com os dados da literatura. Encontramos um aumento do IVRT nos animais associação HA e câncer e o exercício preveniu este aumento em ambos os grupos treinados. Observamos uma redução de MV Decel somente no grupo ShrT e o exercício preveniu esta redução, a MV E/A estava reduzida somente no grupo ShrT-Ex. O TFA preveniu o aumento da TEI no grupo ShrT-Ex comparado ao grupo WkyT, indicando assim uma melhora da função cardíaca global induzida pelo treinamento, sugerindo um atraso no desenvolvimento da IC neste modelo animal induzido pelo TFA.



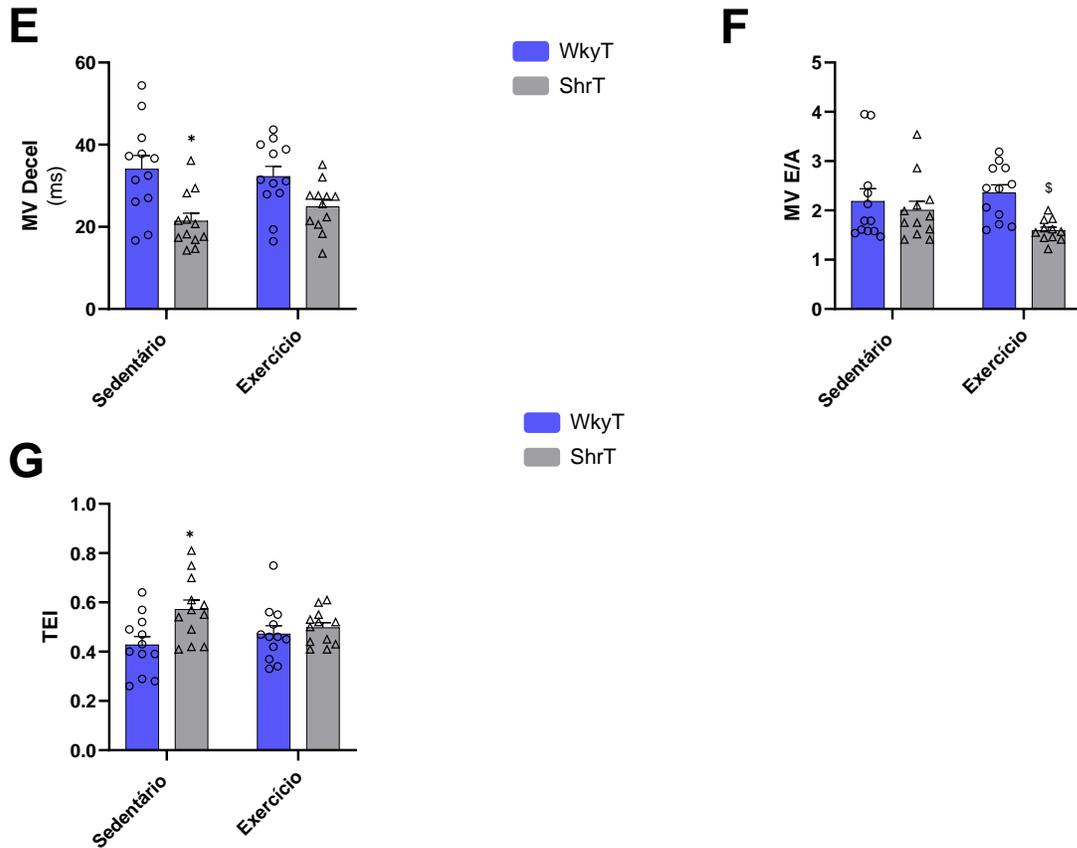


Figura 20. Função cardíaca pelo ecocardiograma.

Fração de ejeção (FE) (A) e fração de encurtamento (FS) (B) foram expressas em porcentagem (%). Tempo de Contração Isovolumétrico (IVCT) (C), tempo de relaxamento isovolumétrico (IVRT) (D) expresso em milissegundo (ms). A desaceleração da onda E (MV Decel) (E) também foi expressa em milissegundo (ms). Razão das ondas E/A (MV E/A) (F). Índice de performance miocárdica (TEI) (G). Grupos: WkyT, indica Wistar Kyoto Tumor (n = 14); WkyT-Ex, Wistar Kyoto Tumor Exercício (n = 12); ShrT, Shr Tumor (n = 12) e ShrT-Ex, Tumor Exercício (n = 12). Os resultados são expressos como média ± EPM. Análise estatística: *Two-way* ANOVA, teste *post hoc* de Tukey. Diferença significativa vs. *WkyT, $p < 0,05$; \$WkyT-Ex, $p < 0,05$.

6.5 Análise de morfologia cardíaca

O peso do VE (Fig. 21.A) estava reduzido no grupo WkyT-Ex ($0,019 \pm 0,0004$ g/mm; $p < 0,01$) comparado ao grupo WkyT ($0,022 \pm 0,0005$ g/mm). Por outro lado, quando analisamos o peso do VE no grupo ShrT-Ex encontramos um aumento ($0,023 \pm 0,0002$ g/mm; $p < 0,05$) comparado ao grupo ShrT ($0,021 \pm 0,0005$ g/mm). Também

observamos um aumento no grupo ShrT-Ex ($0,023 \pm 0,0002$ g/mm; $p < 0,0001$) quando comparado ao grupo WkyT-Ex ($0,019 \pm 0,0004$ g/mm). Não encontramos diferenças no peso do VD para nenhum grupo avaliado (Fig. 21.B).

Em relação ao peso dos átrios (Fig. 21.C), encontramos uma redução no grupo ShrT ($0,0014 \pm 0,00001$ g/mm; $p < 0,05$) comparado ao grupo WkyT ($0,0018 \pm 0,00001$ g/mm). Não foi observado efeito do TFA nesta redução no grupo ShrT-Ex ($0,0013 \pm 0,00001$ g/mm; $p < 0,01$) comparado ao grupo WkyT ($0,0018 \pm 0,00001$ g/mm).

O TFA promoveu um aumento da massa do VE corrigida (Fig. 21.D) no grupo ShrT-Ex (667 ± 18 mg; $p < 0,01$) comparada ao grupo WkyT-Ex (610 ± 25 mg) sugerindo um papel hipertrófico induzido pelo TFA no remodelamento patológico na associação HA e câncer.

O VDF (Fig. 21.E) estava reduzido no grupo ShrT (477 ± 11 mm; $p < 0,01$), comparado ao grupo WkyT (468 ± 23 mm). Por outro lado, o TFA preveniu a redução do VDF no grupo ShrT-Ex comparado ao grupo WkyT. Não encontramos diferenças em relação ao VSF (Fig. 21.F).

O septo interventricular na diástole (Fig. 21.G) estava aumentado no grupo ShrT ($1,3 \pm 0,04$ mm; $p < 0,001$) comparado ao grupo WkyT ($1,1 \pm 0,02$ mm). Entretanto, no grupo ShrT-Ex o septo estava reduzido ($1,1 \pm 0,05$ mm; $p < 0,05$) comparado ao grupo ShrT ($1,3 \pm 0,04$ mm), embora mantivesse aumentado no grupo ShrT-Ex ($1,1 \pm 0,05$ mm; $p < 0,01$), comparado ao grupo WkyT-Ex ($1 \pm 0,03$ mm).

No septo interventricular na sístole (Fig. 21.H) encontramos um aumento no grupo ShrT ($2,2 \pm 0,05$ mm; $p < 0,05$) comparado ao grupo WkyT ($2 \pm 0,04$ mm). Houve uma redução no grupo ShrT-Ex ($1,9 \pm 0,09$ mm; $p < 0,01$) comparado ao grupo ShrT ($2,2 \pm 0,05$ mm) quando submetido ao TFA.

O DDVE (Fig. 21.I) estava reduzido no grupo ShrT ($8,4 \pm 0,1$ mm; $p < 0,01$) comparado ao grupo WkyT ($9,1 \pm 0,2$ mm). Por outro lado, o TFA preveniu a redução do DDVE no grupo ShrT-Ex comparado ao grupo WkyT. Não observamos diferença em relação ao DSVE (Fig. 21.J).

A PP na diástole (Fig. 21.K) estava aumentada no grupo ShrT ($1,3 \pm 0,04$ mm; $p < 0,05$) comparado ao grupo WkyT ($1,17 \pm 0,04$ mm). Corroborando, o TFA preveniu o aumento da PP na diástole no grupo ShrT-Ex comparado ao grupo WkyT. Não encontramos diferença na PP na sístole (Fig. 21.L).

A espessura relativa da parede (ERP) (Fig. 21.M) estava aumentada no grupo ShrT ($0,32 \pm 0,007$; $p < 0,0001$) comparado ao grupo WkyT ($0,25 \pm 0,008$). Foi observado, por outro lado, uma redução da ERP no grupo ShrT-Ex ($0,27 \pm 0,009$; $p < 0,01$), comparado ao grupo ao grupo ShrT ($0,32 \pm 0,007$). O aumento no grupo ShrT-Ex ($0,27 \pm 0,009$; $p < 0,05$) ainda foi mantido comparado ao grupo WkyT-Ex ($0,24 \pm 0,006$).

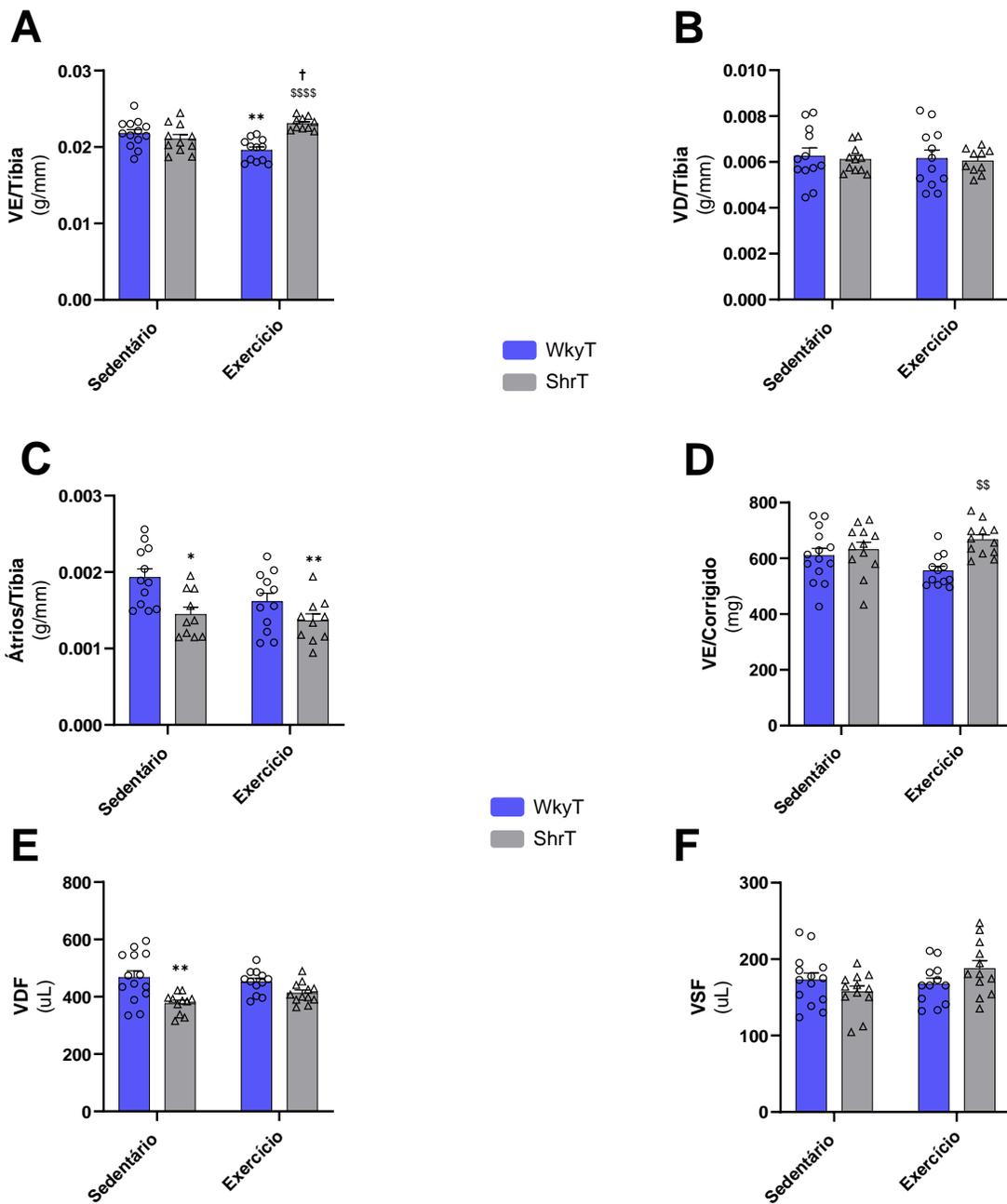
Estes dados morfológicos mostram o efeito benéfico do TFA no remodelamento cardíaco reverso na associação HA e câncer.

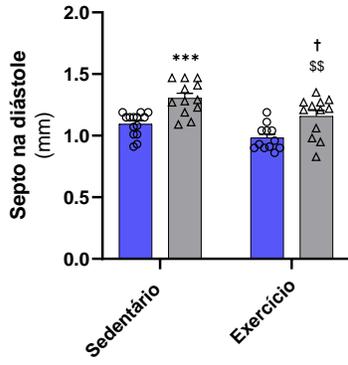
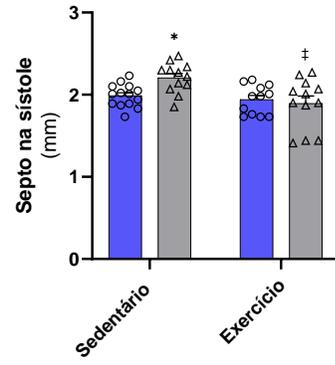
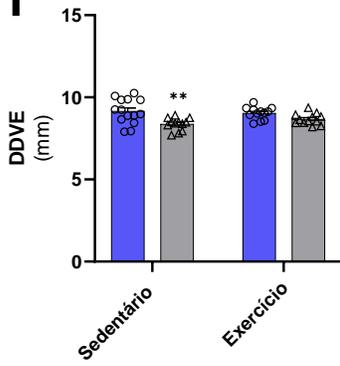
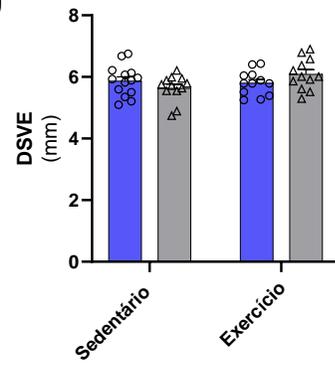
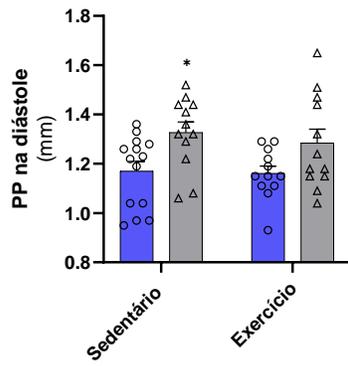
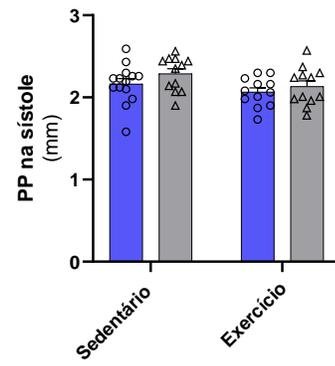
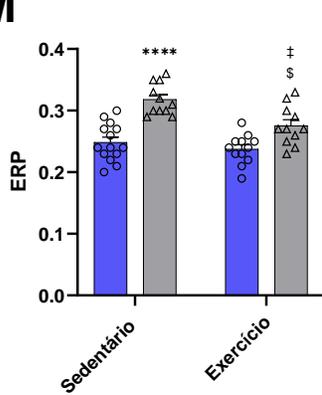
Em nossos dados do primeiro lote experimental, encontramos uma redução de VE em ambos os grupos portadores de tumor (Fig. 10.A;B). Por outro lado, quando os animais realizam o TFA encontramos um aumento do peso do VE normalizando pela tíbia no grupo ShrT-Ex. Sendo assim, o TFA preveniu a atrofia encontrada. Não encontramos diferenças no peso de VD, por outro lado os átrios dos animais ShrT e ShrT-Ex estavam reduzidos comparados ao grupo WkyT.

Em relação aos parâmetros morfológicos obtidos pelo ecocardiograma, em animais Shr foram observadas as seguintes alterações na literatura: aumento da DSVE e ERP nos animais sedentários e o treinamento foi capaz de prevenir este aumento (TARDELLI et al., 2022). Em relação às alterações cardiovasculares durante o câncer, uma revisão destacou alterações como: diminuição da PP do VE, do septo interventricular e ERP (BELLOUM; RANNOU-BEKONO; FAVIER, 2017).

Em nosso trabalho, encontramos uma redução do VDF somente do grupo ShrT, um aumento do septo na diástole em ambos os grupos hipertensos e uma redução do septo na sístole no grupo ShrT-Ex comparado ao grupo ShrT. Encontramos também uma redução do DDVE no grupo ShrT e o treinamento preveniu esta redução. Observamos um aumento da PP na diástole no grupo ShrT e quando analisamos a ERP encontramos um aumento também no grupo ShrT em comparação ao controle e o treinamento foi

capaz de prevenir este aumento no grupo ShrT-Ex. No entanto, ele ainda foi maior em comparação ao grupo WkyT-Ex, mostrando assim um efeito benéfico do exercício na morfologia cardíaca frente a associação HA e câncer.



G**H****I****J****K****L****M**

■ WkyT
■ ShrT

■ WkyT
■ ShrT

■ WkyT
■ ShrT

Figura 21. Alterações morfológicas cardíacas na relação bidirecional HA e câncer e o papel do TFA.

Os resultados foram corrigidos pelo comprimento da tibia representado em milímetros (mm). Ventrículo esquerdo (VE/tibia) (A), ventrículo direito (VD/tibia) (B), e átrios (Átrios/tibia) (C) foram expressos em grama (g) divididos pelo comprimento da tibia (mm). A massa do ventrículo esquerdo corrigida (D) foi expressa em miligrama (mg), o volume diastólico final (VDF) (E) e volume sistólico final (VSF) (F) foram medidos em microlitros (μL), o septo interventricular na diástole (G) e na sístole (H) foram expressos em milímetros (mm), diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (DDVE) (I), diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo (DSVE) (J) e parede posterior (PP) na diástole e sístole (K,L) foram expressas em milímetros (mm) e espessura relativa da parede (ERP) (M). Grupos: WkyT, indica Wistar Kyoto Tumor (n = 14); WkyT-Ex, Wistar Kyoto Tumor Exercício (n = 12); ShrT, Shr Tumor (n = 12) e ShrT-Ex, Tumor Exercício (n = 12). Os resultados são expressos como média \pm EPM. Análise estatística: *Two-way* ANOVA, teste *post hoc* de Tukey. Diferença significativa vs. *WkyT, $p < 0,05$; **WkyT, $p < 0,01$; ***WkyT, $p < 0,001$; ****WkyT, $p < 0,0001$; †ShrT, $p < 0,05$; ‡ShrT, $p < 0,01$; \$WkyT-Ex $p < 0,05$; \$\$WkyT-Ex $p < 0,01$; \$\$\$WkyT-Ex, $p < 0,0001$.

6.6 Influência do TFA nas proteínas sarcoméricas de remodelamento cardíaco patológico

Como normalizador de expressão gênica utilizamos o gene 18s (Fig. 22.A). A miosina de cadeia pesada do tipo alfa (αMHC) (Fig. 22.B) estava aumentada nos grupos WkyT-Ex ($244 \pm 14,7$ % do controle; $p < 0,0001$) e ShrT-Ex ($242 \pm 13,8$ % do controle; $p < 0,0001$) comparado ao grupo WkyT (100 ± 4 % do controle). Também observamos um aumento no grupo ShrT-Ex ($242 \pm 13,8$ % do controle; $p < 0,0001$), comparado ao grupo ShrT ($114 \pm 8,2$ % do controle). Em relação à miosina de cadeia pesada do tipo beta (βMHC) (Fig. 22.C), encontramos uma redução somente no grupo ShrT-Ex ($45 \pm 5,7$ % do controle; $p < 0,0001$) comparado aos grupos WkyT ($100 \pm 5,8$ % do controle) e ShrT ($102 \pm 8,3$ % do controle). Encontramos uma redução também no grupo ShrT-Ex ($45 \pm 5,7$ % do controle; $p < 0,01$) comparado ao grupo WkyT-Ex ($83 \pm 8,8$ % do controle). Quando avaliamos a razão $\alpha\text{MHC}/\beta\text{MHC}$ (Fig. 22.D), observamos um aumento no grupo WkyT-Ex ($3,3 \pm 0,5$; $p < 0,001$) comparado ao grupo WkyT ($1 \pm 0,06$). O grupo ShrT-Ex apresentou um aumento ($6 \pm 0,7$; $p < 0,0001$), comparado aos grupos WkyT ($1 \pm 0,06$) e ShrT ($1,1 \pm 0,06$). Houve um aumento também no grupo ShrT-Ex ($6 \pm 0,7$; $p < 0,001$) comparado ao grupo WkyT-Ex ($3,3 \pm 0,5$). Estes dados mostram que o TFA previne uma

mudança em direção a um perfil de expressão de genes fetais com redução de β MHC e de um remodelamento cardíaco patológico.

Como observamos na primeira etapa do estudo, um dos marcadores de lesão cardíaca é a troca de α MHC por β MHC, troca esta característica de um remodelamento cardíaco patológico (KLOS et al., 2017). Nossos resultados mostraram que o TFA foi capaz de prevenir a mudança do perfil de fibras, em que encontramos um aumento de α MHC em ambos os grupos treinados e uma redução de β MHC somente no grupo ShrT-Ex. Quando realizamos a razão α MHC/ β MHC encontramos um aumento na razão em ambos os grupos treinados, no entanto este aumento foi maior no grupo ShrT-Ex, destacando um efeito mais acentuado do treinamento neste grupo, prevenindo o remodelamento cardíaco patológico.

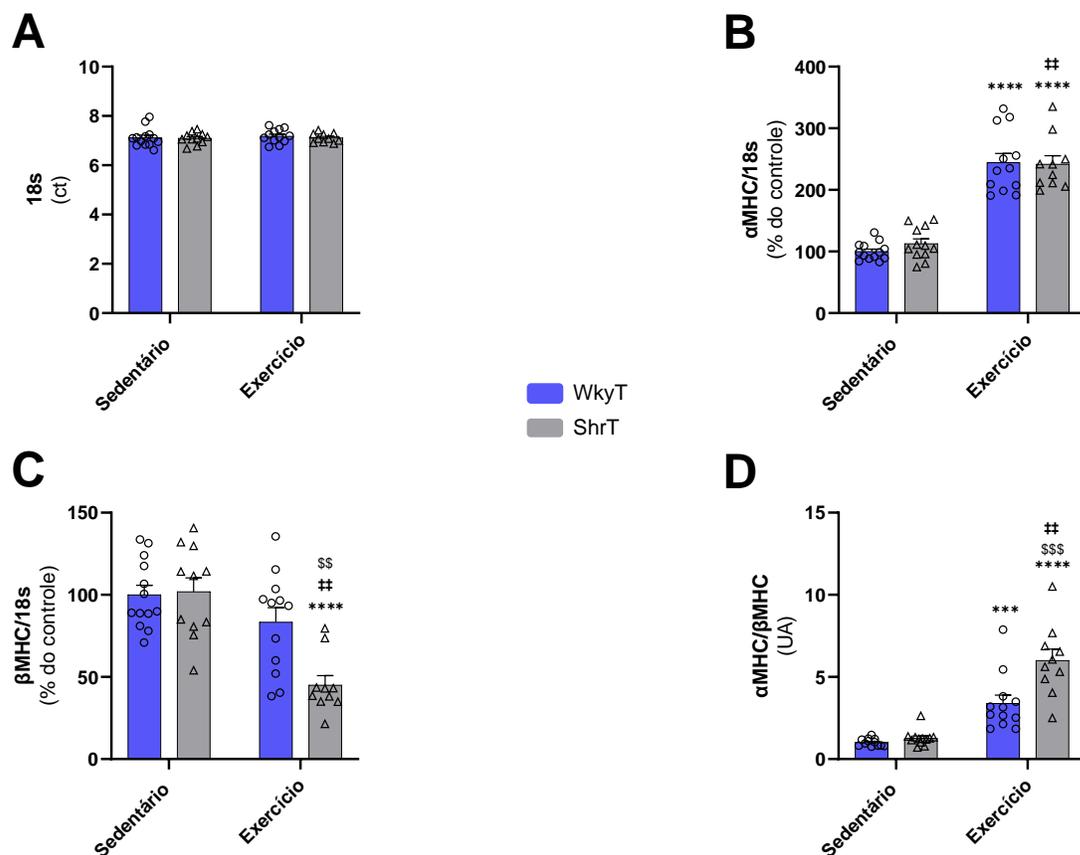


Figura 22. Expressão gênica de marcadores de remodelamento cardíaco patológico e o efeito do TFA. O resultado do normalizador 18s (A) foi expresso utilizando o método de limiar comparativo de ciclos (Ct). Os resultados da expressão gênica foram expressos em porcentagem do controle (% do controle) para os genes: α MHC (B) e β MHC (C). Já a razão α MHC/ β MHC (D) foi expressa em unidade arbitrária (UA).

Grupos: WkyT, indica Wistar Kyoto Tumor (n = 13); WkyT-Ex, Wistar Kyoto Tumor Exercício (n = 12); ShrT, Shr Tumor (n = 12) e ShrT-Ex, Tumor Exercício (n = 10). Os resultados são expressos como média \pm EPM. Análise estatística: *Two-way* ANOVA, teste *post hoc* de Tukey. Diferença significativa vs. ***WkyT, p < 0,001; ****WkyT, p < 0,0001; ††ShrT, p < 0,0001; \$\$WkyT-Ex p < 0,01; \$\$\$WkyT-Ex, p < 0,001.

6.7 Efeito do TFA sobre os marcadores inflamatórios cardíacos na associação HA e câncer

O gene do fator de necrose tumoral (TNF- α) (Fig. 23.A) estava aumentado no grupo ShrT (155 \pm 15,9 % do controle; p < 0,01) em comparação ao grupo WkyT (100 \pm 10,6 % do controle). O TFA não promoveu uma mudança no perfil de expressão de TNF- α em que o aumento de expressão do grupo ShrT-Ex (146 \pm 14,6 % do controle; p < 0,05) foi mantido comparado aos grupos WkyT e WkyT-Ex (83 \pm 8,6 % do controle). Por outro lado, a interleucina 6 (IL-6) (Fig. 23.B), estava reduzida somente no grupo ShrT-Ex (41 \pm 5,3 % do controle; p < 0,05) comparada tanto ao grupo WkyT (100 \pm 16,3 % do controle) quanto ao grupo ShrT (100 \pm 16,4 % do controle), sugerindo um papel benéfico na redução inflamatória cardíaca via IL-6. Em relação a interleucina 10 (IL-10) (Fig. 23.C), observamos uma redução em sua expressão nos grupos WkyT-Ex (61 \pm 6,3 % do controle; p < 0,01) e ShrT-Ex (62 \pm 5,2 % do controle; p < 0,01), comparados ao grupo WkyT (100 \pm 8,4 % do controle).

Um dos mecanismos conhecidos por gerar atrofia tanto muscular quanto cardíaca durante a progressão do câncer é o aumento na liberação de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-6, ainda o aumento dessas citocinas vem sendo descrito como um possível link entre as doenças cardiovasculares e o câncer (BERTERO et al., 2018). De fato, estudos já mostraram níveis elevados de TNF- α e IL-6 em portadores de tumor Walker-256 (CELLA et al., 2020) e também em animais Shr sedentários (CHEN et al., 2021).

Em nossos dados, mostramos que o TFA gerou um aumento de TNF- α em ambos os grupos Shr e em relação a IL-6 o treinamento gerou uma redução em sua expressão no grupo ShrT-Ex, mostrando um efeito benéfico do TFA, reduzindo a inflamação cardíaca via IL-6.

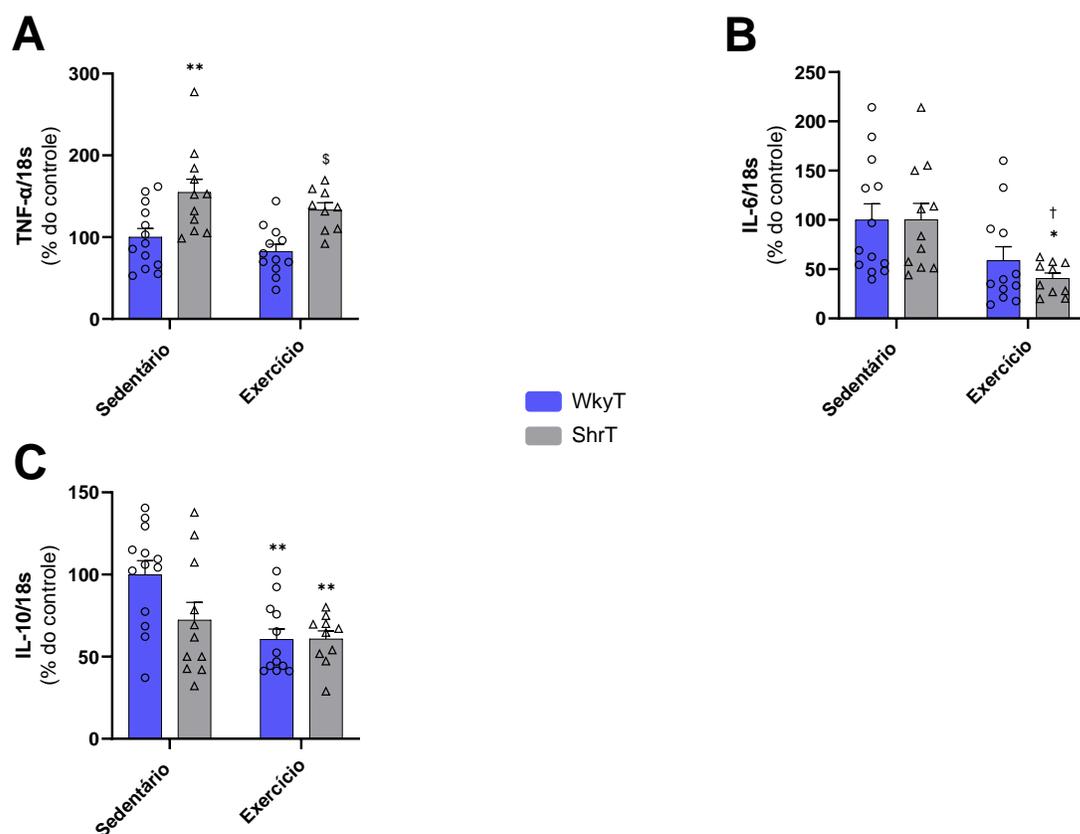


Figura 23. Expressão gênica de marcadores inflamatórios cardíacos e o TFA

O resultado do normalizador 18s foi expresso utilizando o método de limiar comparativo de ciclos (Ct). Os resultados da expressão gênica foram expressos em porcentagem do controle (% do controle) para os genes: TNF α , IL-6 e IL-10. Grupos: WkyT, indica Wistar Kyoto Tumor (n = 13); WkyT-Ex, Wistar Kyoto Tumor Exercício (n = 12); ShrT, Shr Tumor (n = 11) e ShrT-Ex, Tumor Exercício (n = 10). Os resultados são expressos como média \pm EPM. Análise estatística: Two-way ANOVA, teste *post hoc* de Tukey. Diferença significativa vs. *WkyC, p < 0,05; **WkyC, p < 0,01; †ShrC, p < 0,05; \$WkyT p < 0,05.

6.8 Análises de síntese e degradação proteica cardíaca e o efeito do TFA

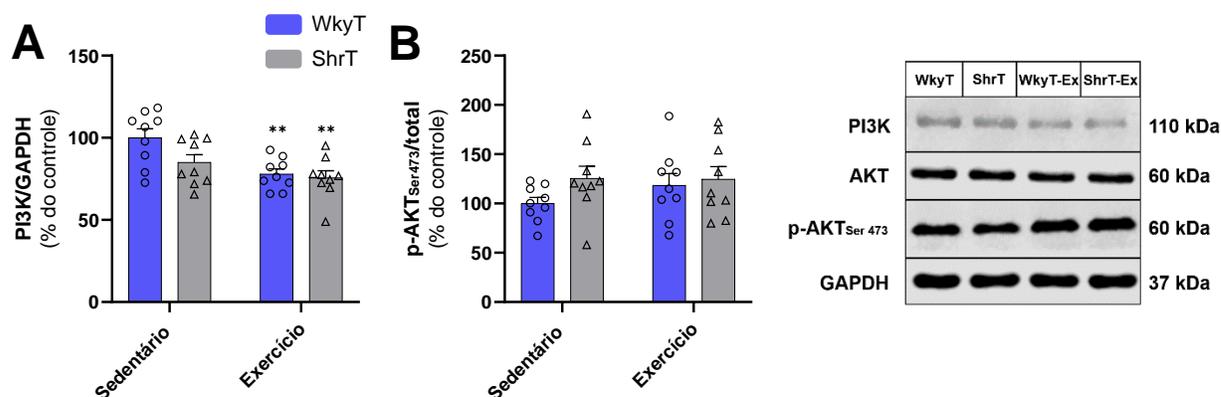
A expressão da proteína PI3K (Fig. 24.A), normalizada pelo GAPDH, foi reduzida nos grupos WkyT-Ex (78 \pm 3,1 % do controle; p < 0,01) e ShrT-Ex (76 \pm 4,3 % do controle; p < 0,01) comparados ao grupo WkyT (100 \pm 5,5 % do controle). Não encontramos diferenças na expressão da proteína p-AKT normalizada pela AKT total (Fig. 24.B) e p-GSK-3 (Fig. 24.C) (Glicogênio sintase quinase) normalizada pelo total.

A expressão da p-4EBP1 (Fig. 24.D) normalizada pelo total estava reduzida no grupo ShrT ($69 \pm 4,9$ % do controle; $p < 0,0001$) comparado ao grupo WkyT ($100 \pm 3,4$ % do controle). Por outro lado, encontramos um aumento de sua expressão no grupo ShrT-Ex (102 ± 5 % do controle; $p < 0,0001$) comparado ao grupo ShrT ($69 \pm 4,9$ % do controle). Não encontramos diferença na proteína GATA4 (Fig. 24.E) normalizada por GAPDH, em ambos os grupos experimentais.

Animais Shr que realizaram o TFA tiveram uma expressão proteínica de p-PI3K aumentada como efeito do treinamento e os animais que permaneceram sedentários tiveram uma expressão reduzida. Os pesquisadores também encontraram um aumento de p-AKT nos animais Shr treinados, sugerindo assim um aumento do perfil pró-sobrevivência nestes animais (HUANG et al., 2012; LIN et al., 2019). Em contrapartida, um estudo mostrou que a expressão de PI3K total não foi alterada em animais Shr sedentário e o exercício não modulou a via, o mesmo aconteceu com a proteína p-Akt que não teve sua expressão alterada pelo TFA (GARCIARENA et al., 2009; LIBONATI et al., 2011).

No modelo de câncer C26, a razão p-AKT/AKT estava reduzida nos animais sedentários e o TFA preveniu esta redução sendo que o mesmo foi observado com a razão p-4EBP1/4BP1 (MORINAGA et al., 2021).

Em nossos resultados, encontramos uma redução na expressão de PI3K total em ambos os grupos expostos ao protocolo de TFA, por outro lado, a razão p-AKT/AKT não foi alterada em nenhum grupo experimental. Não encontramos diferenças em relação à razão p-GS3K/GS3K e GATA4 total. Em contrapartida, observamos que o TFA preveniu a redução da razão p-4EBP1/4BP1, que pode estar associada a uma redução nos níveis inflamatórios como a IL-6, prevenindo assim a atrofia cardíaca.



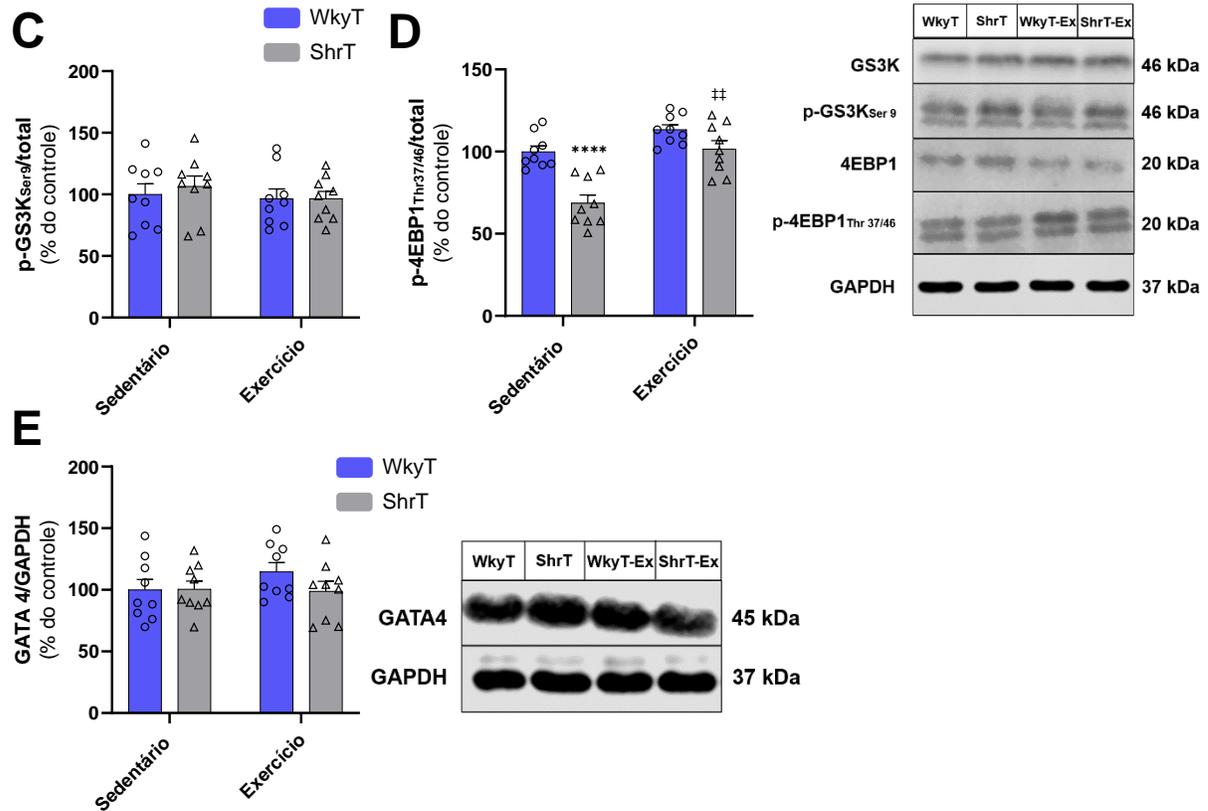


Figura 24. Análises de síntese e degradação proteica cardíaca e o efeito do TFA

As proteínas totais foram normalizadas pelo GAPDH. Os resultados da expressão proteica foram expressos em porcentagem do controle (% do controle) para as proteínas: PI3K, AKT total e fosforilada, GS3K total e fosforilada, 4EBP1 total e fosforilada e GATA4. Grupos: WkyT, indica Wistar Kyoto Tumor (n = 9); WkyT-Ex, Wistar Kyoto Tumor Exercício (n = 9); ShrT, Shr Tumor (n = 9) e ShrT-Ex, Tumor Exercício (n = 9). Os resultados são expressos como média ± EPM. Análise estatística: *Two-way ANOVA*, teste *post hoc* de Tukey. Diferença significativa vs. **WkyC, $p < 0,01$; \$\$WkyT $p < 0,01$.

6.9 Análises de proteínas de sobrevivência e apoptose celular cardíaca

Quando analisamos a expressão das proteínas envolvidas na sobrevivência e apoptose celular cardíaca não encontramos diferenças significativas nas proteínas: BAD (Fig.25.A) e BCL-x (Fig.25.B).

Estudos avaliando animais Shr mostraram um aumento das proteínas envolvidas na sobrevivência e apoptose celular. Animais Shr sedentários tiveram a expressão aumentada no tecido cardíaco de BAD e BCL-x, por outro lado, aqueles animais que

foram expostos ao TFA tiveram uma redução das proteínas BAD e BCI-x, indicando assim uma redução da apoptose celular nestes animais (HUANG et al., 2012; LIN et al., 2019). Em nossos resultados, não encontramos diferenças nas expressões de ambas as proteínas e o TFA não promoveu alterações em suas expressões.

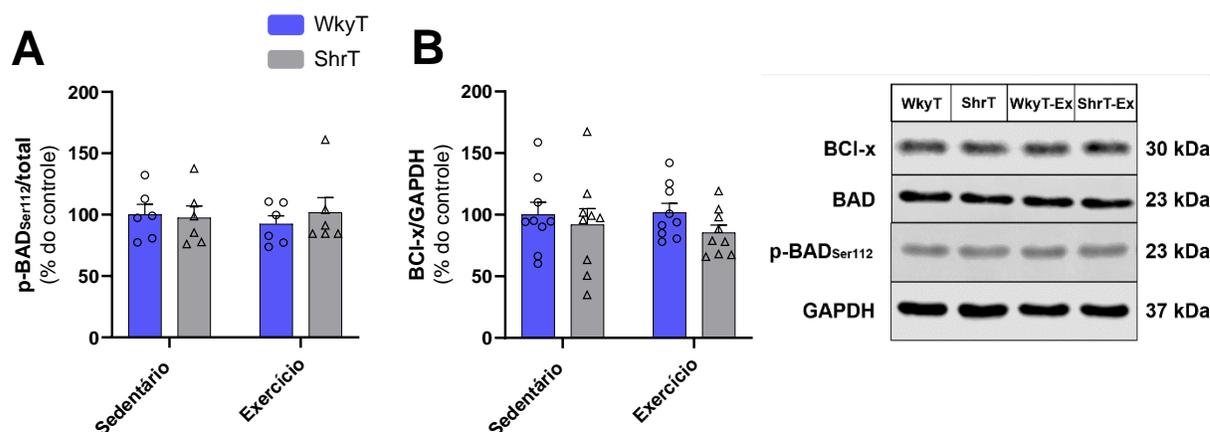


Figura 25. Análises de proteínas de sobrevivência e apoptose celular cardíaca

As proteínas totais foram normalizadas pelo GAPDH. Os resultados da expressão proteica foram expressos em porcentagem do controle (% do controle) para as proteínas: BAD e BCI-x. Grupos: WkyT, indica Wistar Kyoto Tumor (n = 9); WkyT-Ex, Wistar Kyoto Tumor Exercício (n = 9); ShrT, Shr Tumor (n = 9) e ShrT-Ex, Tumor Exercício (n = 9). Os resultados são expressos como média \pm EPM. Análise estatística: *Two-way* ANOVA, teste *post hoc* de Tukey.

6.10 Família do microRNA-208a cardíaco e circulante e o papel do TFA

Para normalizar os microRNAs cardíacos, utilizamos o U6 por não ter apresentado diferenças entre os grupos. O miR-208a cardíaco (Fig. 26.A) apresentou uma redução em sua expressão no grupo ShrT ($59 \pm 3,7$ % do controle; $p < 0,05$), comparado ao grupo WkyT ($100 \pm 12,5$ % do controle). Houve também uma redução no grupo ShrT-Ex ($50 \pm 7,7$ % do controle; $p < 0,05$) comparado tanto ao grupo WkyT ($100 \pm 12,5$ % do controle) quanto ao grupo WkyT-Ex ($92 \pm 14,3$ % do controle).

O miR-208b (Fig. 26.B), apresentou uma redução no grupo ShrT ($36 \pm 3,7$ % do controle; $p < 0,001$) comparado ao grupo WkyT ($100 \pm 14,6$ % do controle). Encontramos uma redução também no grupo ShrT-Ex ($38 \pm 4,7$ % do controle; $p < 0,01$) comparado

ao grupo WkyT ($100 \pm 14,6$ % do controle) e também uma redução ($38 \pm 4,7$ % do controle; $p < 0,05$) comparado ao grupo WkyT-Ex ($90 \pm 13,1$ % do controle).

De modo similar, a expressão do miR-499 (Fig. 26.C) foi reduzida nos grupos ShrT ($53 \pm 3,7$ % do controle; $p < 0,05$) e ShrT-Ex ($55 \pm 7,5$ % do controle; $p < 0,05$) comparados ao grupo WkyT ($100 \pm 12,7$ % do controle).

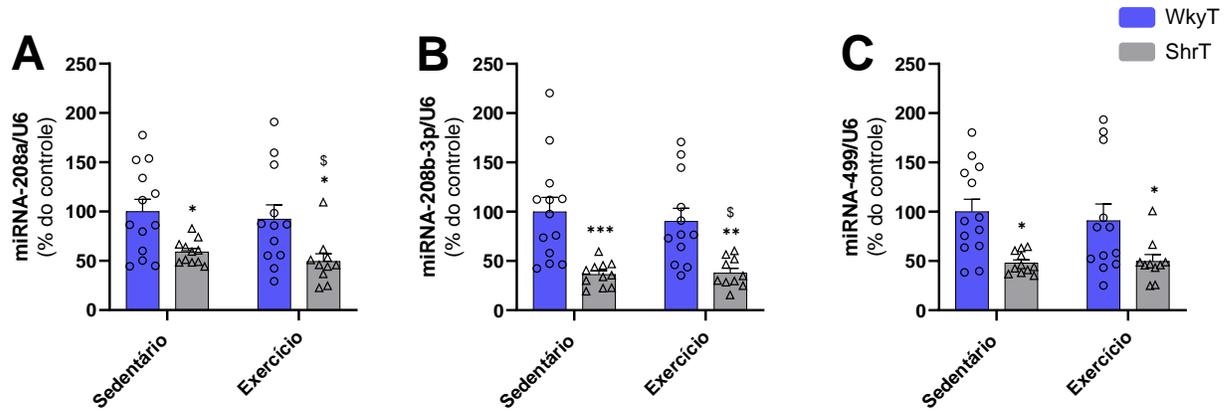
A normalização do miRNA circulante foi realizada utilizando o miR-39 (Fig. 26.D). O miR-208a (Fig. 26.E) estava reduzido no grupo WkyT-Ex ($69 \pm 3,6$ % do controle; $p < 0,01$) comparado ao grupo WkyT ($100 \pm 6,9$ % do controle). Encontramos uma redução no grupo ShrT-Ex ($44 \pm 7,9$ % do controle; $p < 0,0001$) comparado ao grupo WkyT ($100 \pm 6,9$ % do controle). O grupo ShrT-Ex ($44 \pm 7,9$ % do controle; $p < 0,001$) apresentou uma redução em sua expressão também comparado ao grupo ShrT (88 ± 8 % do controle).

Dados prévios do nosso grupo mostraram uma redução da expressão do miRNA-208a em um protocolo de treinamento de maior volume. Por outro lado, o miRNA-208b teve uma redução em ambos os grupos que realizaram o protocolo de treinamento independente do volume, e em relação ao miRNA-499 não foram encontradas diferenças em sua expressão em nenhum dos grupos avaliados (SOCl et al., 2016b). Em nossos resultados, encontramos uma redução na expressão dos miRNAs-208a, -208b e -499 nos grupos portadores de HA e o TFA mostrou não gerar mudanças nas expressões dos miRNAs em questão, sendo assim um efeito da hipertensão.

Por outro lado, quando avaliamos a expressão do miRNA-208a na circulação, encontramos um efeito oposto do que foi visto no primeiro lote experimental, em que foi observado um papel benéfico do TFA capaz de reduzir a expressão do miRNA-208a na circulação em ambos os grupos treinados, sugerindo que esta redução do miRNA-208a sistêmico poderia estar envolvido neste menor crescimento tumoral destes animais, embora nenhum efeito adicional tenha sido observado na associação das doenças induzido pelo TFA.



miRNAs cardíacos



miRNAs circulantes

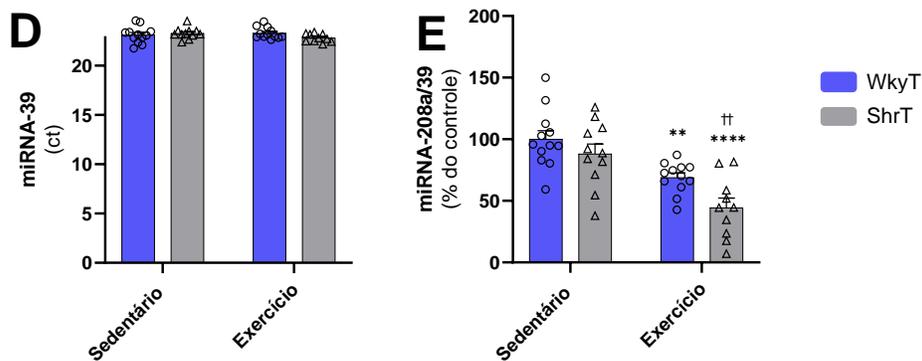


Figura 26. Expressão de miRNAs cardíaco e circulante e o papel o TFA.

O U6 foi utilizado para normalizar os miRNAs cardíacos e o miR-39 foi utilizado para normalizar o miRNA circulante. Os resultados da expressão dos miRNAs foram expressos em porcentagem do controle (% do controle) para os miRNAs cardíacos: -208a (A), -208b (B) e -499 (C) e para o miRNA circulante: -208a (E). Grupos: WkyT, indica Wistar Kyoto Tumor (n = 13); WkyT-Ex, Wistar Kyoto Tumor Exercício (n = 12); ShrT, Shr Tumor (n = 11) e ShrT-Ex, Tumor Exercício (n = 10). Os resultados são expressos como média ± EPM. Análise estatística: *Two-way* ANOVA, teste *post hoc* de Tukey. Diferença significativa vs. *WkyT, p < 0,05; **WkyT, p < 0,01; ***WkyT, p < 0,001; ****WkyT, p < 0,0001; ††ShrT, p < 0,001; \$WkyT-Ex p < 0,05.

Na segunda etapa do estudo, analisamos o papel do TFA na associação HA e câncer. Nossos resultados mostraram que o TFA preveniu a atrofia e disfunção do VE, através de uma redução da inflamação, prevenindo o desarranjo de proteínas sarcoméricas e reduzindo a expressão do miRNA-208a circulante. Melhorando assim a capacidade física, reduzido o volume tumoral e caquexia (Fig. 27).

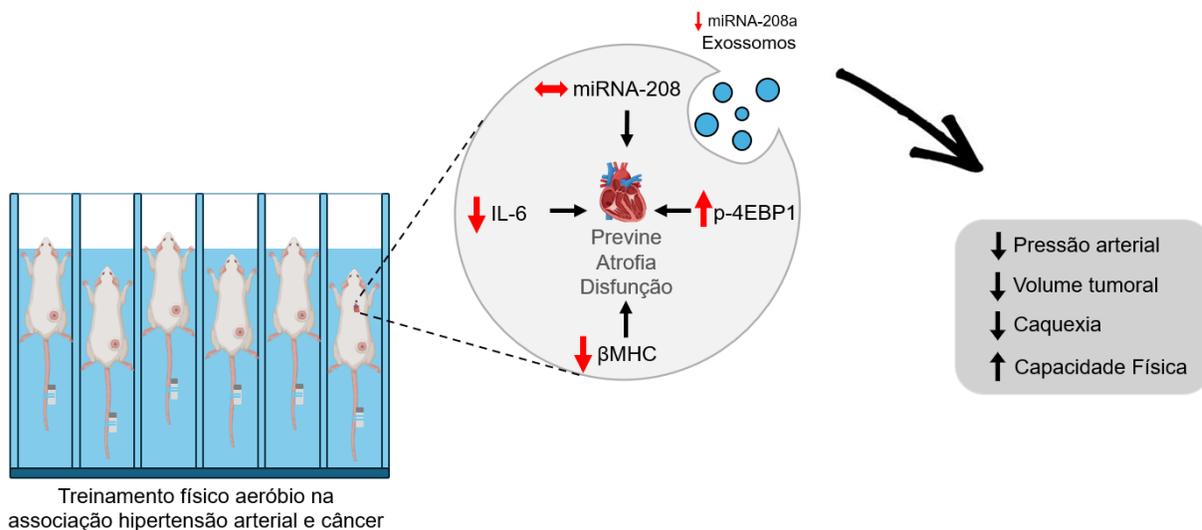


Figura 27. Efeito do TFA na associação HA e câncer prevenindo a atrofia, disfunção do VE e incapacidade física.

7 Conclusão

Os resultados do presente estudo destacam os efeitos negativos da relação bidirecional entre HA e câncer reduzindo a expressão da família do miRNA-208 cardíaco e aumentando a expressão do miRNA-208a circulante, gerando um maior crescimento tumoral, caquexia, atrofia cardíaca associado a uma disfunção diastólica do VE, com maior perfil inflamatório, desarranjo de proteínas sarcoméricas e incapacidade física. Por outro lado, o TFA atenuou os efeitos negativos da associação HA e câncer, modulando miRNAs cardíacos e circulantes, reduzindo o crescimento tumoral e caquexia repercutindo em uma prevenção da atrofia cardíaca, disfunção do VE e incapacidade física dos animais.

8 REFERÊNCIAS

- ALP, P. R.; NEWSHOLME, E. A.; ZAMMIT, V. A. Activities of citrate synthase and NAD⁺-linked and NADP⁺-linked isocitrate dehydrogenase in muscle from vertebrates and invertebrates. **Biochemical Journal**, v. 154, n. 3, p. 689–700, 15 mar. 1976.
- ALVES, C. R. R. et al. Exercise training reverses cancer-induced oxidative stress and decrease in muscle COPS2/TRIP15/ALIEN. **Molecular Metabolism**, v. 39, p. 101012, set. 2020.
- AMBROS, V. The functions of animal microRNAs. **Nature**, v. 431, n. 7006, p. 350–355, 15 set. 2004.
- AMERI, P.; BERTERO, E.; MEIJERS, W. C. Cancer is a comorbidity of heart failure. **European heart journal**, v. 44, n. 13, p. 1133–1135, 1 abr. 2023.
- ANKER, M. S. et al. Advanced cancer is also a heart failure syndrome: a hypothesis. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, p. jcsm.12694, 18 mar. 2021.
- ANTUNES, J. M. M.; FERREIRA, R. M. P.; MOREIRA-GONÇALVES, D. Exercise Training as Therapy for Cancer-Induced Cardiac Cachexia. **Trends in Molecular Medicine**, v. 24, n. 8, p. 709–727, ago. 2018.
- ARMSTRONG, B.; STEVENS, N.; DOLL, R. Retrospective study of the association between use of rauwolfia derivatives and breast cancer in English women. **Lancet (London, England)**, v. 2, n. 7882, p. 672–5, 21 set. 1974.
- ASSI, M.; DUFRESNE, S.; RÉBILLARD, A. Exercise shapes redox signaling in cancer. **Redox biology**, v. 35, p. 101439, ago. 2020.
- BABIARZ, J. E. et al. Determination of the Human Cardiomyocyte mRNA and miRNA Differentiation Network by Fine-Scale Profiling. **Stem Cells and Development**, v. 21, n. 11, p. 1956–1965, 20 jul. 2012.
- 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, 26 nov. 2007.
- BANDONI, R. L. et al. Cholinergic stimulation with pyridostigmine modulates a heart-spleen axis after acute myocardial infarction in spontaneous hypertensive rats. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, p. 9563, 2021.

BARKHUDARYAN, A. et al. Cardiac muscle wasting in individuals with cancer cachexia. **ESC Heart Failure**, v. 4, n. 4, p. 458–467, nov. 2017.

BARRETO, I. DE J. B. et al. Gastos com internações hospitalares por doenças relacionadas à inatividade física no Brasil. **Lecturas: Educación Física y Deportes**, v. 25, n. 265, p. 29–43, 21 jun. 2020.

BARROSO, W. K. S. et al. Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial – 2020. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 116, n. 3, p. 516–658, 3 mar. 2021.

BARTEL, D. P. MicroRNAs. **Cell**, v. 116, n. 2, p. 281–297, jan. 2004.

BELLOUM, Y.; RANNOU-BEKONO, F.; FAVIER, F. B. Cancer-induced cardiac cachexia: Pathogenesis and impact of physical activity. **Oncology Reports**, v. 37, n. 5, p. 2543–2552, maio 2017.

BERGERS, G. et al. Benefits of targeting both pericytes and endothelial cells in the tumor vasculature with kinase inhibitors. **Journal of Clinical Investigation**, v. 111, n. 9, p. 1287–1295, 2003.

BERTERO, E. et al. Linking Heart Failure to Cancer: Background Evidence and Research Perspectives. **Circulation**, v. 138, n. 7, p. 735–742, 14 ago. 2018.

BERTERO, E. et al. Cancer Incidence and Mortality According to Pre-Existing Heart Failure in a Community-Based Cohort. **JACC. CardioOncology**, v. 4, n. 1, p. 98–109, mar. 2022.

BI, L. New aspects in the mechanisms of hypertension and the pathophysiology of the arterial tree. In: **Safar ME ed. Macro- and Microcirculation in Hypertension**, v. 3, n. 12, 2005.

BLOEMBERG, D. et al. Autophagy is altered in skeletal and cardiac muscle of spontaneously hypertensive rats. **Acta physiologica (Oxford, England)**, v. 210, n. 2, p. 381–91, fev. 2014.

BLUETHMANN, S. M.; MARIOTTO, A. B.; ROWLAND, J. H. Anticipating the “Silver Tsunami”: Prevalence Trajectories and Co-Morbidity Burden among Older Cancer Survivors in the United States. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 25, n. 7, p. 1029–1036, 1 jul. 2016.

BOOTH, F. W. et al. Role of Inactivity in Chronic Diseases: Evolutionary Insight and Pathophysiological Mechanisms. **Physiological reviews**, v. 97, n. 4, p. 1351–1402,

2017.

BORA, V. et al. Systemic study of selected histone deacetylase inhibitors in cardiac complications associated with cancer cachexia. **Canadian journal of physiology and pharmacology**, v. 100, n. 3, p. 240–251, mar. 2022.

BORGES, F. H. et al. Oxidative and proteolytic profiles of the right and left heart in a model of cancer-induced cardiac cachexia. **Pathophysiology**, v. 21, n. 4, p. 257–265, nov. 2014.

BORGHI, F. et al. A new perspective of lactatogenesis by isolated adipocytes. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 498, p. 110560, dez. 2019.

BORGHI, F. et al. The influence of hypertensive environment on adipose tissue remodeling measured by fluorescence lifetime imaging in spontaneously hypertensive rats. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 506, p. 110758, abr. 2020.

BOSTON COLLABORATIVE DRUG SURVEILLANCE PROGRAM. RESERPINE AND BREAST CANCER. **The Lancet**, v. 304, n. 7882, p. 669–671, set. 1974.

BOZKURT, B. et al. **Contributory Risk and Management of Comorbidities of Hypertension, Obesity, Diabetes Mellitus, Hyperlipidemia, and Metabolic Syndrome in Chronic Heart Failure: A Scientific Statement from the American Heart Association**. [s.l: s.n.]. v. 134

CALLIS, T. E. et al. MicroRNA-208a is a regulator of cardiac hypertrophy and conduction in mice. **Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n. 9, p. 2772–2786, 1 set. 2009.

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.

CARVALHO GISAH, FABIO FORTUNATO GUILGEN, G. et al. **Recomendações de atividade física durante e após tratamento oncológico**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Oncologia Clínica, 2023. Disponível em: <<https://sboc.org.br/servicos/consensos-e-guias>>.

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. **European Journal of Nutrition**, v. 59, n. 2, p. 661–669, 26 mar. 2020.

CHAPMAN, J. A. W. et al. Competing causes of death from a randomized trial of extended adjuvant endocrine therapy for breast cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 100, n. 4, p. 252–260, 2008.

CHEN, H. et al. Chronic Intermittent Hypobaric Hypoxia Decreases High Blood Pressure by Stabilizing the Vascular Renin-Angiotensin System in Spontaneously Hypertensive Rats. **Frontiers in Physiology**, v. 12, 24 mar. 2021.

COHEN, J. B. et al. Cancer Therapy-Related Hypertension: A Scientific Statement From the American Heart Association. **Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)**, v. 80, n. 3, p. e46–e57, mar. 2023.

COPLAND, E. et al. Antihypertensive treatment and risk of cancer: an individual participant data meta-analysis. **The Lancet. Oncology**, v. 22, n. 4, p. 558–570, 2021.

CUI, H.-B. et al. MiR-208a enhances cell proliferation and invasion of gastric cancer by targeting SFRP1 and negatively regulating MEG3. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 102, p. 31–39, set. 2018.

CUSPIDI, C. et al. Prevalence of left-ventricular hypertrophy in hypertension: An updated review of echocardiographic studies. **Journal of Human Hypertension**, v. 26, n. 6, p. 343–349, 2012.

DA COSTA, T. S. R. et al. Breast Cancer Promotes Cardiac Dysfunction Through Deregulation of Cardiomyocyte Ca²⁺-Handling Protein Expression That is Not Reversed by Exercise Training. **Journal of the American Heart Association**, v. 10, n. 5, p. e018076, fev. 2021.

DA SILVA, N. D. et al. Swimming Training in Rats Increases Cardiac MicroRNA-126 Expression and Angiogenesis. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 44, n. 8, p. 1453–1462, ago. 2012.

DAMATTO, R. L. et al. Heart failure-induced skeletal myopathy in spontaneously hypertensive rats. **International Journal of Cardiology**, v. 167, n. 3, p. 698–703, 2013.

DAWBER, T. R.; MEADORS, G. F.; MOORE, F. E. Epidemiological approaches to heart disease: the Framingham Study. **American journal of public health**, v. 41, n. 3, p. 279–281, 1951.

DE ANDRADE, L. H. S. et al. Aerobic exercise training improves oxidative stress and ubiquitin proteasome system activity in heart of spontaneously hypertensive rats.

Molecular and cellular biochemistry, v. 402, n. 1–2, p. 193–202, abr. 2015.

DE BOER, R. A. et al. Common mechanistic pathways in cancer and heart failure. A scientific roadmap on behalf of the Translational Research Committee of the Heart Failure Association (HFA) of the European Society of Cardiology (ESC). **European journal of heart failure**, v. 22, n. 12, p. 2272–2289, dez. 2020.

DE WAARD; DE LAIVE, J.; BAANDERS-VANHALEWIJN, E. A. On the bimodal age distribution of mammary carcinoma. **British journal of cancer**, v. 14, p. 437–48, set. 1960.

DEMINICE, R. et al. Resistance exercise prevents impaired homocysteine metabolism and hepatic redox capacity in Walker-256 tumor-bearing male Wistar rats. **Nutrition**, v. 32, n. 10, p. 1153–1158, out. 2016.

DICKHOUT, J. G.; LEE, R. M. K. W. Blood pressure and heart rate development in young spontaneously hypertensive rats. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 274, n. 3, p. H794–H800, 1 mar. 1998.

DIWAN, A.; DORN, G. W. Decompensation of cardiac hypertrophy: Cellular mechanisms and novel therapeutic targets. **Physiology**, v. 22, n. 1, p. 56–64, 2007.

DRAZNER, M. H. The progression of hypertensive heart disease. **Circulation**, v. 123, n. 3, p. 327–334, 2011.

DUPONT, S. et al. The onset of left ventricular diastolic dysfunction in SHR rats is not related to hypertrophy or hypertension. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 302, n. 7, p. H1524-32, 1 abr. 2012.

ENGEL, L. E. et al. The high-intensity interval training mitigates the cardiac remodeling in spontaneously hypertensive rats. **Life Sciences**, v. 308, p. 120959, nov. 2022.

FATIMA SILVA, F. et al. Akt activation by insulin treatment attenuates cachexia in Walker-256 tumor-bearing rats. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 121, n. 11, p. 4558–4568, 14 nov. 2020.

FEIHL, F. et al. Hypertension and microvascular remodelling. **Cardiovascular Research**, v. 78, n. 2, p. 274–285, 1 maio 2008.

FERNANDES, L. G. et al. Exercise training delays cardiac remodeling in a mouse model of cancer cachexia. **Life sciences**, v. 260, p. 118392, 1 nov. 2020.

FERNANDES, T. et al. Aerobic Exercise Training–Induced Left Ventricular Hypertrophy

Involves Regulatory MicroRNAs, Decreased Angiotensin-Converting Enzyme-Angiotensin II, and Synergistic Regulation of Angiotensin-Converting Enzyme 2-Angiotensin (1-7). **Hypertension**, v. 58, n. 2, p. 182–189, ago. 2011.

FERNANDES, T. et al. Exercise Training Prevents the Microvascular Rarefaction in Hypertension Balancing Angiogenic and Apoptotic Factors. **Hypertension**, v. 59, n. 2, p. 513–520, fev. 2012.

FERNANDES, T. et al. Aerobic exercise training promotes physiological cardiac remodeling involving a set of microRNAs. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 309, n. 4, p. H543–H552, 15 ago. 2015.

FINKE, D. et al. Cancer-A Major Cardiac Comorbidity With Implications on Cardiovascular Metabolism. **Frontiers in physiology**, v. 12, p. 729713, 2021.

FOLTZ, C. J.; ULLMAN-CULLERE, M. Guidelines for Assessing the Health and Condition of Mice. **Lab Animal**, v. 28, n. 4, p. 28–32, 1999.

GARCIARENA, C. D. et al. Endurance training in the spontaneously hypertensive rat conversion of pathological into physiological cardiac hypertrophy. **Hypertension**, v. 53, n. 4, p. 708–714, 2009.

GEBRUERS, N. et al. The effect of training interventions on physical performance, quality of life, and fatigue in patients receiving breast cancer treatment: a systematic review. **Supportive Care in Cancer**, v. 27, n. 1, p. 109–122, 9 jan. 2019.

GERALDELLI, D. et al. Tumor development in rats and cancer cachexia are reduced by treatment with botryosphaeran by increasing apoptosis and improving the metabolic profile. **Life Sciences**, v. 252, p. 117608, jul. 2020.

GHIGO, A. et al. Editorial: Cardio-oncology and reverse cardio-oncology: the manifold interconnections between heart failure and cancer. **Frontiers in physiology**, v. 14, p. 1205810, 2023.

GOMES-SANTOS, I. L. et al. Exercise Training Preserves Myocardial Strain and Improves Exercise Tolerance in Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity. **Frontiers in cardiovascular medicine**, v. 8, p. 605993, 2021.

GOMES, J. L. P. et al. Effects of Aerobic Exercise Training on MyomiRs Expression in Cachectic and Non-Cachectic Cancer Mice. **Cancers**, v. 13, n. 22, 16 nov. 2021.

GROARKE, J. D. et al. Association of post-diagnosis cardiorespiratory fitness with

cause-specific mortality in cancer. **European Heart Journal - Quality of Care and Clinical Outcomes**, v. 6, n. 4, p. 315–322, 1 out. 2020.

GUDSOORKAR, P. et al. Onco-hypertension: An Emerging Specialty. **Advances in Chronic Kidney Disease**, v. 28, n. 5, p. 477- 489.e1, set. 2021.

HAJJAR, L. A. et al. Diretriz Brasileira de Cardio-oncologia – 2020. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 115, n. 5, p. 1006–1043, 18 nov. 2020.

HANDY, C. E. et al. Synergistic Opportunities in the Interplay Between Cancer Screening and Cardiovascular Disease Risk Assessment. **Circulation**, v. 138, n. 7, p. 727–734, 14 ago. 2018.

HASIN, T. et al. Patients With Heart Failure Have an Increased Risk of Incident Cancer. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 62, n. 10, p. 881–886, set. 2013.

HASIN, T. et al. Heart Failure After Myocardial Infarction Is Associated With Increased Risk of Cancer. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 68, n. 3, p. 265–271, jul. 2016.

HEDMAN, K. et al. Peak exercise SBP and future risk of cardiovascular disease and mortality. **Journal of hypertension**, v. 40, n. 2, p. 300–309, 2022.

HEINONEN, O. P. et al. Reserpine use in relation to breast cancer. **Lancet (London, England)**, v. 2, n. 7882, p. 675–7, 21 set. 1974.

HERRMANN, J. et al. Evaluation and Management of Patients With Heart Disease and Cancer: Cardio-Oncology. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 89, n. 9, p. 1287–1306, set. 2014.

HONG, Y. et al. Exercise intervention prevents early aged hypertension-caused cardiac dysfunction through inhibition of cardiac fibrosis. **Aging**, v. 14, n. 10, p. 4390–4401, 31 maio 2022.

HOONING, M. J. et al. Long-term risk of cardiovascular disease in 10-year survivors of breast cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 99, n. 5, p. 365–375, 2007.

HU, C. et al. Effects of physical exercise on body fat and laboratory biomarkers in cancer patients: a meta-analysis of 35 randomized controlled trials. **Supportive Care in Cancer**, 30 abr. 2022.

HUANG, C.-Y. et al. Anti-apoptotic and pro-survival effects of exercise training on hypertensive hearts. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 112, n.

5, p. 883–91, mar. 2012.

HUANG, X. et al. High expression of microRNA-208 is associated with cardiac hypertrophy via the negative regulation of the sex-determining region Y-box 6 protein.

Experimental and therapeutic medicine, v. 10, n. 3, p. 921–926, set. 2015.

IMPROTA-CARIA, A. C. et al. MicroRNAs regulating signaling pathways in cardiac fibrosis: potential role of the exercise training. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 326, n. 3, p. H497–H510, 1 mar. 2024.

INCA. Incidência de câncer no Brasil: Estimativa 2020. **Instituto Nacional de Câncer (INCA)**, 2019.

IRIGOYEN, M. C. et al. Fisiopatologia da Hipertensão: o que avançamos? **Revista Brasileira de Hipertensao**, v. 12, n. 4, p. 245–250, 2005.

JAISWAL, V. et al. Association between heart failure and the incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis. **European heart journal open**, v. 3, n. 5, p. oead073, set. 2023.

JI, X. et al. Plasma miR-208 as a Biomarker of Myocardial Injury. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 11, p. 1944–1949, 1 nov. 2009.

JORDÃO, C. P. et al. Aerobic Swim Training Restores Aortic Endothelial Function by Decreasing Superoxide Levels in Spontaneously Hypertensive Rats. **Clinics (Sao Paulo, Brazil)**, v. 72, n. 5, p. 310–316, maio 2017.

JOVANI, M. et al. Cardiovascular disease related circulating biomarkers and cancer incidence and mortality: is there an association? **Cardiovascular research**, v. 118, n. 10, p. 2317–2328, 27 jul. 2022.

KHOSRAVI, N. et al. Exercise training, circulating cytokine levels and immune function in cancer survivors: A meta-analysis. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 81, n. August, p. 92–104, 2019.

KIDOGUCHI, S. et al. New Concept of Onco-Hypertension and Future Perspectives. **Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)**, v. 77, n. 1, p. 16–27, 2021.

KITSIS, R. N.; RIQUELME, J. A.; LAVANDERO, S. Heart Disease and Cancer: Are the Two Killers Colluding? **Circulation**, v. 138, n. 7, p. 692–695, 14 ago. 2018.

KLOS, M. et al. Altered myocyte contractility and calcium homeostasis in alpha-myosin heavy chain point mutations linked to familial dilated cardiomyopathy. **Archives of**

Biochemistry and Biophysics, v. 615, p. 53–60, fev. 2017.

KOELWYN, G. J. et al. Myocardial infarction accelerates breast cancer via innate immune reprogramming. **Nature Medicine**, v. 26, n. 9, p. 1452–1458, 13 set. 2020.

KOELWYN, G. J. et al. Reverse cardio-oncology: Exploring the effects of cardiovascular disease on cancer pathogenesis. **Journal of molecular and cellular cardiology**, v. 163, p. 1–8, fev. 2022.

KUBOTA, Y. et al. Physical Activity and Lifetime Risk of Cardiovascular Disease and Cancer. **Medicine and science in sports and exercise**, v. 49, n. 8, p. 1599–1605, 2017.

LAJOIE, C.; CALDERONE, A.; BÉLIVEAU, L. Exercise training enhanced the expression of myocardial proteins related to cell protection in spontaneously hypertensive rats. **Pflugers Archiv : European journal of physiology**, v. 449, n. 1, p. 26–32, out. 2004.

LEE, D. H. et al. Long-Term Leisure-Time Physical Activity Intensity and All-Cause and Cause-Specific Mortality: A Prospective Cohort of US Adults. **Circulation**, 25 jul. 2022a.

LEE, E. K. P. et al. Global Burden, Regional Differences, Trends, and Health Consequences of Medication Nonadherence for Hypertension During 2010 to 2020: A Meta-Analysis Involving 27 Million Patients. **Journal of the American Heart Association**, v. 11, n. 17, p. e026582, 6 set. 2022b.

LEE, Y. I. et al. Effects of exercise training on pathological cardiac hypertrophy related gene expression and apoptosis. **European journal of applied physiology**, v. 97, n. 2, p. 216–24, maio 2006.

LEUNG, V.; ZHANG, E.; PANG, D. S. Real-time application of the Rat Grimace Scale as a welfare refinement in laboratory rats. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 31667, 17 out. 2016.

LI, G.; LI, J.; GAO, F. Exercise and Cardiovascular Protection. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 1228, p. 205–216, 2020.

LI, H. et al. Mir-208 promotes cell proliferation by repressing SOX6 expression in human esophageal squamous cell carcinoma. **Journal of Translational Medicine**, v. 12, n. 1, p. 196, 2014.

LI, J. et al. Progressive Cardiac Metabolic Defects Accompany Diastolic and Severe

Systolic Dysfunction in Spontaneously Hypertensive Rat Hearts. **Journal of the American Heart Association**, v. 12, n. 10, p. e026950, 16 maio 2023.

LIBONATI, J. R. et al. Exercise training improves systolic function in hypertensive myocardium. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 111, n. 6, p. 1637–43, dez. 2011.

LIGIBEL, J. A. et al. Exercise, Diet, and Weight Management During Cancer Treatment: ASCO Guideline. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 40, n. 22, p. 2491–2507, 1 ago. 2022.

LIN, Y.-Y. et al. Antiapoptotic and mitochondrial biogenetic effects of exercise training on ovariectomized hypertensive rat hearts. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 126, n. 6, p. 1661–1672, 1 jun. 2019.

LIU, A. et al. miR-208-Induced Epithelial to Mesenchymal Transition of Pancreatic Cancer Cells Promotes Cell Metastasis and Invasion. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 69, n. 2, p. 341–346, 7 jun. 2014.

LIU, C. et al. Alamandine attenuates hypertension and cardiac hypertrophy in hypertensive rats. **Amino Acids**, v. 50, n. 8, p. 1071–1081, 12 ago. 2018.

LOWES, B. D. et al. Changes in gene expression in the intact human heart. Downregulation of alpha-myosin heavy chain in hypertrophied, failing ventricular myocardium. **The Journal of clinical investigation**, v. 100, n. 9, p. 2315–24, 1 nov. 1997.

MAGNUSSEN, C. et al. Global Effect of Modifiable Risk Factors on Cardiovascular Disease and Mortality. **New England Journal of Medicine**, v. 389, n. 14, p. 1273–1285, 5 out. 2023.

MALACHIAS, M. et al. 7ª Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial: Capítulo 2 - Diagnóstico e Classificação. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, 2016.

MANCIA, G. et al. 2023 ESH Guidelines for the management of arterial hypertension The Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension: Endorsed by the International Society of Hypertension (ISH) and the European Renal Associat. **Journal of hypertension**, v. 41, n. 12, p. 1874–2071, 1 dez. 2023.

MANNE, N. D. P. K. et al. Altered cardiac muscle mTOR regulation during the

progression of cancer cachexia in the ApcMin/+ mouse. **International journal of oncology**, v. 42, n. 6, p. 2134–40, jun. 2013.

MCKENZIE, C. V et al. Splenomegaly: Pathophysiological bases and therapeutic options. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 94, p. 40–43, jan. 2018.

MEDEIROS, A. et al. Swimming training increases cardiac vagal activity and induces cardiac hypertrophy in rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 12, p. 1909–1917, 2004.

MEIJERS, W. C. et al. Heart Failure Stimulates Tumor Growth by Circulating Factors. **Circulation**, v. 138, n. 7, p. 678–691, 14 ago. 2018.

MENSAH, G. A. et al. Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risks, 1990-2022. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 82, n. 25, p. 2350–2473, 19 dez. 2023.

MESSERLI, F. H.; RIMOLDI, S. F.; BANGALORE, S. The Transition From Hypertension to Heart Failure: Contemporary Update. **JACC: Heart Failure**, v. 5, n. 8, p. 543–551, 2017.

MIYACHI, M. et al. Exercise training alters left ventricular geometry and attenuates heart failure in dahl salt-sensitive hypertensive rats. **Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)**, v. 53, n. 4, p. 701–7, abr. 2009.

MOHAMMED, T. et al. Etiology and management of hypertension in patients with cancer. **Cardio-oncology (London, England)**, v. 7, n. 1, p. 14, 6 abr. 2021.

MONTGOMERY, R. L. et al. Therapeutic Inhibition of miR-208a Improves Cardiac Function and Survival During Heart Failure. **Circulation**, v. 124, n. 14, p. 1537–1547, 4 out. 2011.

MOREIRA, V. M. et al. Aerobic Exercise Training Attenuates Tumor Growth and Reduces Insulin Secretion in Walker 256 Tumor-Bearing Rats. **Frontiers in Physiology**, v. 9, 8 maio 2018.

MOREIRA, V. M. et al. Moderate exercise training since adolescence reduces Walker 256 tumour growth in adult rats. **The Journal of Physiology**, v. 597, n. 15, p. 3905–3925, 18 ago. 2019.

MORINAGA, M. et al. Aerobic Exercise Ameliorates Cancer Cachexia-Induced Muscle

Wasting through Adiponectin Signaling. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 6, p. 3110, 18 mar. 2021.

MULVANY, M. J. Small Artery Remodelling in Hypertension. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 110, n. 1, p. 49–55, jan. 2012.

MYERS, J. et al. Exercise capacity and mortality among men referred for exercise testing. **The New England journal of medicine**, v. 346, n. 11, p. 793–801, 14 mar. 2002.

NAVICKAS, R. et al. Identifying circulating microRNAs as biomarkers of cardiovascular disease: a systematic review. **Cardiovascular Research**, v. 111, n. 4, p. 322–337, set. 2016.

NCD RISK FACTOR COLLABORATION (NCD-RISC). Worldwide trends in hypertension prevalence and progress in treatment and control from 1990 to 2019: a pooled analysis of 1201 population-representative studies with 104 million participants. **Lancet (London, England)**, v. 398, n. 10304, p. 957–980, 2021.

NEVES, R. V. P. et al. Resistance Training in Spontaneously Hypertensive Rats with Severe Hypertension. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 106, n. 3, p. 201–9, mar. 2016.

PADILHA, C. S. et al. Resistance exercise attenuates skeletal muscle oxidative stress, systemic pro-inflammatory state, and cachexia in Walker-256 tumor-bearing rats. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, v. 42, n. 9, p. 916–923, set. 2017.

PADRÃO, A. I. et al. Endurance training prevents TWEAK but not myostatin-mediated cardiac remodelling in cancer cachexia. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 567, p. 13–21, fev. 2015.

PAGAN, L. U. et al. Long-term low intensity physical exercise attenuates heart failure development in aging spontaneously hypertensive rats. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 36, n. 1, p. 61–74, 2015.

PELOZIN, B. R. A. et al. mTOR signaling-related microRNAs as cardiac hypertrophy modulators in high-volume endurance training. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 132, n. 1, p. 126–139, 1 jan. 2022.

PEREIRA, N. et al. Noncoding RNAs in the Cardiovascular System: Exercise Training Effects. In: **Muscle Cells - Recent Advances and Future Perspectives**. [s.l.]

IntechOpen, 2020.

QIN, X.; JIANG, B.; ZHANG, Y. 4E-BP1, a multifactor regulated multifunctional protein. **Cell cycle (Georgetown, Tex.)**, v. 15, n. 6, p. 781–6, 2016.

QUIROGA, C. et al. Moderate Exercise in Spontaneously Hypertensive Rats Is Unable to Activate the Expression of Genes Linked to Mitochondrial Dynamics and Biogenesis in Cardiomyocytes. **Frontiers in Endocrinology**, v. 11, 19 ago. 2020.

RAMOS, A. E. et al. Specific circulating microRNAs display dose-dependent responses to variable intensity and duration of endurance exercise. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 315, n. 2, p. H273–H283, 1 ago. 2018.

RAUSCH, V. et al. Understanding the common mechanisms of heart and skeletal muscle wasting in cancer cachexia. **Oncogenesis**, v. 10, n. 1, p. 1, 8 jan. 2021.

REZENDE, L. M. T. DE et al. Is the Wistar Rat a more Suitable Normotensive Control for SHR to Test Blood Pressure and Cardiac Structure and Function? **International Journal of Cardiovascular Sciences**, 13 jul. 2021.

RITCHIE, H.; ROSER, M. **Causes of death**. Disponível em: <<https://ourworldindata.org/causes-of-death>>.

ROMERO, S. A.; MINSON, C. T.; HALLIWILL, J. R. The cardiovascular system after exercise. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 122, n. 4, p. 925–932, 1 abr. 2017.

ROQUE, F. R. et al. Aerobic exercise reduces oxidative stress and improves vascular changes of small mesenteric and coronary arteries in hypertension. **British journal of pharmacology**, v. 168, n. 3, p. 686–703, fev. 2013.

ROTH, G. A. et al. Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risk Factors, 1990–2019: Update From the GBD 2019 Study. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 76, n. 25, p. 2982–3021, 22 abr. 2020.

RUF, R. et al. Onco-hypertension: Overview of hypertension with anti-cancer agents. **Journal of Onco-Nephrology**, v. 5, n. 1, p. 57–69, 24 fev. 2021.

SANCHIS-GOMAR, F. et al. Exercise effects on cardiovascular disease: from basic aspects to clinical evidence. **Cardiovascular Research**, v. 118, n. 10, p. 2253–2266, 27 jul. 2022.

SANTOS, M. DE O. et al. Estimativa de Incidência de Câncer no Brasil, 2023-2025. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 69, n. 1, 6 fev. 2023.

SCHMIDT, S. F. et al. Cancer Cachexia: More Than Skeletal Muscle Wasting. **Trends in Cancer**, v. 4, n. 12, p. 849–860, dez. 2018.

SCOTT, J. M. et al. Cardiovascular Late Effects and Exercise Treatment in Breast Cancer: Current Evidence and Future Directions. **Canadian Journal of Cardiology**, v. 32, n. 7, p. 881–890, jul. 2016.

SERETIS, A. et al. Association between blood pressure and risk of cancer development: a systematic review and meta-analysis of observational studies. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 8565, 12 dez. 2019.

SHINGU, Y. et al. Myocardial performance (Tei) index is normal in diastolic and systolic heart failure induced by pressure overload in rats. **European Journal of Echocardiography**, v. 11, n. 10, p. 829–833, 1 dez. 2010.

SIEGEL, R. L.; GIAQUINTO, A. N.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2024. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 74, n. 1, p. 12–49, 17 jan. 2024.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2020. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 70, n. 1, p. 7–30, 2020.

SOCI, U. P. R. et al. MicroRNAs 29 are involved in the improvement of ventricular compliance promoted by aerobic exercise training in rats. **Physiological Genomics**, v. 43, n. 11, p. 665–673, jun. 2011.

SOCI, U. P. R. et al. Epigenetic control of exercise training-induced cardiac hypertrophy by miR-208. **Clinical Science**, v. 130, n. 22, p. 2005–2015, 1 nov. 2016a.

SOCI, U. P. R. et al. Epigenetic control of exercise training-induced cardiac hypertrophy by miR-208. **Clinical science (London, England : 1979)**, v. 130, n. 22, p. 2005–2015, 1 nov. 2016b.

SPRINGER, J. et al. Prevention of liver cancer cachexia-induced cardiac wasting and heart failure. **European heart journal**, v. 35, n. 14, p. 932–41, abr. 2014.

STEVENS, S. C. W. et al. Losartan treatment attenuates tumor-induced myocardial dysfunction. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 85, p. 37–47, ago. 2015.

STOUT, N. L. et al. A Systematic Review of Exercise Systematic Reviews in the Cancer

Literature (2005-2017). **PM and R**, v. 9, n. 9, p. S347–S384, 2017.

STRONGMAN, H. et al. Does Cardiovascular Mortality Overtake Cancer Mortality During Cancer Survivorship?: An English Retrospective Cohort Study. **JACC. CardioOncology**, v. 4, n. 1, p. 113–123, mar. 2022.

SUNG, H. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209–249, 2021.

TAN, Z. et al. The Effect of Blood Flow-Restricted Low Resistance Training on Microvascular Circulation of Myocardium in Spontaneously Hypertensive Rats. **Frontiers in Physiology**, v. 13, 24 mar. 2022.

TARDELLI, L. P. et al. Benefits of combined exercise training on arterial stiffness and blood pressure in spontaneously hypertensive rats treated or not with dexamethasone. **Frontiers in Physiology**, v. 13, 15 ago. 2022.

TIAN, M. et al. Cardiac alterations in cancer-induced cachexia in mice. **International Journal of Oncology**, v. 37, n. 2, p. 547–557, 23 jun. 2010.

TIAN, M. et al. Evidence for cardiac atrophic remodeling in cancer-induced cachexia in mice. **International journal of oncology**, v. 39, n. 5, p. 1321–6, 5 nov. 2011.

TINI, G. et al. Arterial hypertension in cancer: The elephant in the room. **International Journal of Cardiology**, v. 281, p. 133–139, abr. 2019.

TISDALE, M. J. Mechanisms of cancer cachexia. **Physiological Reviews**, v. 89, n. 2, p. 381–410, 2009.

TISDALE, M. J. Reversing cachexia. **Cell**, v. 142, n. 4, p. 511–512, 2010.

TOBIAS, G. C. et al. Aerobic exercise training mitigates tumor growth and cancer-induced splenomegaly through modulation of non-platelet platelet factor 4 expression. **Scientific reports**, v. 13, n. 1, p. 21970, 11 dez. 2023.

TONETO, A. T. et al. Nutritional leucine supplementation attenuates cardiac failure in tumour-bearing cachectic animals. **Journal of cachexia, sarcopenia and muscle**, v. 7, n. 5, p. 577–586, 2016.

TONY, H.; YU, K.; QIUTANG, Z. MicroRNA-208a Silencing Attenuates Doxorubicin Induced Myocyte Apoptosis and Cardiac Dysfunction. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2015, p. 1–6, 2015.

TSAO, C. W. et al. Heart Disease and Stroke Statistics—2022 Update: A Report From the American Heart Association. **Circulation**, v. 145, n. 8, 22 fev. 2022.

VADUGANATHAN, M. et al. The Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risk: A Compass for Future Health. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 80, n. 25, p. 2361–2371, 20 dez. 2022.

VAN ROOIJ, E. et al. A Family of microRNAs Encoded by Myosin Genes Governs Myosin Expression and Muscle Performance. **Developmental Cell**, v. 17, n. 5, p. 662–673, nov. 2009.

VENTURINI, E. et al. Oncology and Cardiac Rehabilitation: An Underrated Relationship. **Journal of Clinical Medicine**, v. 9, n. 6, p. 1810, 2020.

VIANA, L. R. et al. Leucine-Rich Diet Improved Muscle Function in Cachectic Walker 256 Tumour-Bearing Wistar Rats. **Cells**, v. 10, n. 12, p. 3272, 23 nov. 2021.

VIGELSØ, A.; ANDERSEN, N. B.; DELA, F. The relationship between skeletal muscle mitochondrial citrate synthase activity and whole body oxygen uptake adaptations in response to exercise training. **International journal of physiology, pathophysiology and pharmacology**, v. 6, n. 2, p. 84–101, 2014.

VIRANI, S. S. et al. Heart Disease and Stroke Statistics—2020 Update: A Report From the American Heart Association. **Circulation**, v. 141, n. 9, p. E139–E596, 3 mar. 2020.

WALLACE, J. Humane Endpoints and Cancer Research. **ILAR Journal**, v. 41, n. 2, p. 87–93, 1 jan. 2000.

WANG, X. et al. Emerging roles of microRNA-208a in cardiology and reverse cardio-oncology. **Medicinal Research Reviews**, p. med.21790, 3 fev. 2021.

WHO.
https://www.who.int/gho/mortality_burden_disease/causes_death/top_10/en/.

WORKMAN, P. et al. Guidelines for the welfare and use of animals in cancer research. **British Journal of Cancer**, v. 102, n. 11, p. 1555–1577, 2010.

YU, P. et al. miR-208-3p promotes hepatocellular carcinoma cell proliferation and invasion through regulating ARID2 expression. **Experimental cell research**, v. 336, n. 2, p. 232–41, 15 ago. 2015.

ZHANG, Y. et al. Aerobic exercise of low to moderate intensity corrects unequal changes in BK(Ca) subunit expression in the mesenteric arteries of spontaneously

hypertensive rats. **Physiological research**, v. 66, n. 2, p. 219–233, 4 maio 2017.

ZHAO, X.; WANG, Y.; SUN, X. The functions of microRNA-208 in the heart. **Diabetes research and clinical practice**, v. 160, p. 108004, fev. 2020.

ZHOU, B. et al. Global epidemiology, health burden and effective interventions for elevated blood pressure and hypertension. **Nature Reviews Cardiology**, v. 18, n. 11, p. 785–802, 28 nov. 2021.

9 ANEXO

ANEXO A. Parecer de aprovação do CEUA (Comissão de Ética no Uso de animais) da Escola de Educação Física e Esportes da Universidade de São Paulo EEFE/USP.



São Paulo, 25 de março de 2021.

CERTIFICAÇÃO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeito da associação entre hipertensão e câncer de walker-256 sobre o fenótipo cardíaco e a progressão tumoral: potencial terapêutico do treinamento físico aeróbio", registrada com o número 2021/01 sobre a responsabilidade do Prof. Dr. Tiago Fernandes e do aluno Luís Felipe Rodrigues – que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6899, de 15 de Julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado Ad Referendum pelo coordenador da COMISSÃO DE ETICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DO(A) EEFE-USP, em 24/03/2021.

Vigência da autorização: 30/04/2021 – 30/12/2024
Espécie/linhagem/raça: Ratos isogênico Wistar Kioto/SHR
Nº de animais: 100
Peso/Idade:
Sexo: Macho
Origem: rede de biotérios da USP

Reiteramos a importância de apresentar Relatório Parcial na metade do projeto e Relatório Final ao término da vigência do projeto. Lembramos ainda que qualquer alteração no projeto inicial deve ser comunicada à CEUA, incluindo alteração no número de animais utilizados, bem como a origem dos referidos animais.



Prof. Dr. Guilherme Giannini Artioli
Coordenador da CEUA
EEFE-USP

Ao Prof. Dr. Tiago Fernandes
Docente EEFE-USP

Av. Professor Mello Moraes, 65
CEP 05508-900 | São Paulo - SP | Brasil
55 11 3091-3077 | www.eefe.usp.br