UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE EDUCAÇÃO FÍSICA E ESPORTE

WILLIAN DAS NEVES SILVA

Efeitos do treinamento de força no músculo esquelético em ratos
com caquexia induzida pelo câncer.

São Paulo

2015

WILLIAN DAS NEVES SILVA

Efeitos do treinamento de força no músculo esquelético em ratos
com caquexia induzida pelo câncer

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

Área de Concentração: Biodinâmica do Movimento do Corpo Humano.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Herbert Lancha Junior.

São Paulo

2015

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da Publicação

Serviço de Biblioteca

Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo

Silva, Willian das Neves

Efeitos do treinamento de força no músculo esquelético
em ratos com caquexia induzida pelo câncer / Willian das
Neves Silva. – São Paulo :[s.n.], 2015.

82p.

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

Orientador: Prof. Dr. Antônio Herbert Lancha Junior.

1. Treinamento de força 2. Músculo esquelético
3. Atrofia muscular 4. Perda de peso 5. Neuroplasia
I. Título.

Nome: SILVA, Willian das Neves

Título: Efeitos do treinamento de força no músculo esquelético em ratos com caquexia induzida pelo câncer

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

Data:___/___/___

Banca Examinadora

Prof. Dr.:_____

Instituição:_____Julgamento:_____

_____Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição:_____Julgamento:_____

_____Assinatura: _____

Prof. Dr.:_____

Instituição:_____Julgamento:_____

_____Assinatura: _____

Dedicatória

À Deus todo poderoso, aquele que me capacitou e em todos os caminhos me conduziu para chegar até este momento.

Agradecimentos

À Sra. Mirian das Neves Silva, minha mãe que com sua vida de luta, dedicação e trabalho me ensinou a buscar por mim mesmo e a construir o caminho através do trabalho, dedicação e autonomia.

À minha esposa Eliene Barbosa das Neves, que como companheira esteve ao meu lado, me apoiando a cada dia.

Ao Prof. Dr. Antonio Herbert Lancha Junior e a Profa. Dra. Patrícia Chakur Brum, pela orientação e paciência.

Aos amigos de bancada, Christiano Alves, Ney Robson, Fátima Guimarães, Wagner Dantas, Aline Vasques, por de alguma forma, estarem de maneira mais próxima estarem comigo no decorrer deste tempo.

À toda minha família e parentes.

À todos os amigos dos laboratórios de Nutrição e Metabolismo Aplicados a Atividade Motora, Fisiologia Celular e Molecular do Exercício e Bioquímica e Biologia Celular do Exercício por todas as discussões oferecidas durante o percurso.

À Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela bolsa concedida.

Aos funcionários da comissão de pós-graduação, aos técnicos dos laboratórios, pessoal da limpeza, e à Soninha do café, vocês foram de suma importância durante esse caminho na pós.

À todos os amigos que estiveram comigo e de alguma maneira me deram força, simplesmente por acreditar em mim.

À Deus por ter colocado tantas pessoas boas no meu caminho.

Epígrafe

“Um pouco de ciência nos afasta de Deus, muito nos aproxima.”

Louis Pasteur.

RESUMO

SILVA, W. N. **Título:** Efeitos do treinamento de força no músculo esquelético em ratos com caquexia induzida pelo câncer. 2015. 82f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Educação Física e Esporte, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2015.

A ausência de terapias eficazes para a caquexia permanece como um problema central para o tratamento do câncer no mundo. Em contrapartida, o treinamento de força (*i.e.* também conhecido como treinamento resistido) tem sido amplamente utilizado como uma estratégia não farmacológica anti-catabólica, prevenindo a perda da massa e da função da musculatura esquelética. Entretanto, o papel terapêutico do treinamento de força na caquexia do câncer permanece apenas especulativo. Portanto, nesse estudo avaliamos se o treinamento de força poderia atenuar a perda da massa e da função da musculatura esquelética em um severo modelo de caquexia do câncer em ratos. Para isso, ratos machos da linhagem Wistar foram randomizados em quatro grupos experimentais: 1) ratos sedentários injetados com solução salina na medula óssea (Controle); 2) ratos injetados com solução salina na medula óssea e submetidos ao treinamento de força (Controle + T); 3) ratos sedentários injetados com células do tumor Walker 256 na medula óssea (Tumor); e 4) ratos injetados com células do tumor Walker 256 na medula óssea e submetidos ao treinamento de força (Tumor + T). Foram avaliados a massa e a área de secção transversa da musculatura esquelética, marcadores de disfunção metabólica e do *turnover* proteico, a função da musculatura esquelética *in vivo* e *ex vivo*, o consumo alimentar, o crescimento tumoral e a sobrevivência dos grupos experimentais com tumor. O grupo Tumor apresentou atrofia muscular após quinze dias da injeção das células tumorais

como pode ser observado pela redução na massa dos músculos *Plantaris* (-20,5%) e EDL (-20%). A atrofia no músculo EDL foi confirmada por análises histológicas, demonstrando uma redução de 43,8% na área de secção transversa. Embora o treinamento de força tenha aumentado o conteúdo proteico da lactato desidrogenase e revertido totalmente o conteúdo da forma fosforilada de 4EBP-1 (*i.e.* repressor da transcrição de mRNA), ele não atuou na morfologia da musculatura esquelética nos animais com tumor. Além disso, o treinamento de força não atenuou a perda de função da musculatura esquelética, a anorexia, o crescimento tumoral ou a taxa de mortalidade. Contudo, a força muscular, avaliada pelo teste de 1RM, apresentou uma correlação negativa com a sobrevida dos animais ($p = 0,02$), sugerindo que a perda de força prediz a mortalidade nesse modelo experimental de caquexia do câncer. Em suma, a injeção de células do tumor Walker 256 na medula óssea induz caquexia do câncer em ratos. O treinamento de força não foi eficaz em atenuar a perda de massa e função da musculatura esquelética nesse modelo. Entretanto, a força muscular prediz a sobrevida dos animais, sugerindo que novos estudos são necessários para elucidar o possível efeito terapêutico do treinamento de força para atenuar a caquexia do câncer e a progressão tumoral.

Palavras-chave: Caquexia do câncer, atrofia muscular, treinamento resistido.

ABSTRACT

SILVA, W. N. **Title:** Effects of strength training on skeletal muscle in rats with cachexia-induced cancer. 2015. 82f. Dissertação (Mestrado) – Escola de Educação Física e Esporte, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2015.

The lack of therapies for cachexia is a key problem in cancer treatment. In contrast, resistance exercise training (RET) has been adopted as non-pharmacological anti-catabolic strategy, preventing muscle wasting and muscle dysfunction. However, the role of RET to counteract cancer cachexia is still speculative. Presently, we test whether RET would counteract skeletal muscle wasting in a severe cancer cachexia rat model. Methods: Male Wistar rats were randomly assigned into four experimental groups; 1) untrained control rats injected with saline solution in the bone marrow (control), 2) rats injected with saline solution in the bone marrow and submitted to RET (control + RET), 3) untrained rats injected with Walker 256 tumor cells in the bone marrow (tumor) and 4) rats injected with Walker 256 tumor cells in the bone marrow and submitted to RET (tumor + RET). Skeletal muscle mass and fiber cross sectional area, markers of metabolic and protein turnover impairment, in vivo and ex vivo skeletal muscle function, food intake, tumor growth and mortality rate were assessed. Results: Tumor group displayed skeletal muscle atrophy fifteen days post tumor cells injection as assessed by Plantaris (-20.5%) and EDL (-20.0%) muscle mass. EDL atrophy was confirmed by histological analysis, showing 43.8% decline in the fiber cross sectional area. Even though RET increased the lactate dehydrogenase protein content and fully restored phosphorylated form of 4EBP-1 (i.e. a repressor of mRNA translation) to the

control levels in skeletal muscle, it failed to rescue muscle morphology in tumor-bearing rats. Indeed, RET has not mitigated loss of muscle function, anorexia, tumor growth or mortality rate. However, loss of strength capacity (assessed by 1-RM test performance) demonstrated a negative correlation with rats' survival ($p = 0.02$), suggesting that loss of strength capacity predicts cancer mortality. Conclusions: Bone marrow injection of Walker 256 tumor cells in rats induces cancer cachexia. RET is ineffective to mitigate cancer-induced skeletal muscle wasting in this rat model. However, strength capacity predicts cancer survival, suggesting that new studies are needed to elucidate the putative therapeutic role of different exercise training regimens in counteracting cancer cachexia and tumor progression.

Keywords: Cancer cachexia, muscle atrophy, resistance exercise training

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1. Câncer e caquexia.....	20
2.2. Câncer e exercício.....	22
2.3. Treinamento de força	25
3. JUSTIFICATIVA	27
4. OBJETIVOS.....	28
4.1. Objetivo Geral	28
4.2. Estratégias Experimentais.....	28
5. MÉTODOS	29
5.1. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.....	29
5.2. Protocolo experimental (estratégia 1 caixa de força)	30
5.3. Adaptação e treinamento de força.....	31
5.4. Consumo alimentar e massa muscular e corporal	32
5.5. Função muscular relacionada a coordenação motora (in vivo).....	32
5.6. Histoquímica por atividade da ATPase	33
5.7. Protocolo Experimental (estratégia 2)	33
5.8. Função muscular relacionada a coordenação motora (in vivo) e força (1RM) ...	35
5.9. Inoculação do tumor.....	37
5.10. Consumo alimentar e massa corporal	37
5.11. Eutanásia e coleta de tecidos.....	37
5.12. Imunofluorescência por MHCI.....	38
5.13. Análise de citocinas plasmáticas	39
5.14. Protocolo experimental (estratégia 3)	40
5.15. Inoculação do tumor.....	42
5.16. Consumo alimentar, massa corporal e tumoral	43

5.17. Eutanásia e coleta de tecido.....	43
5.18. Treinamento de força.....	43
5.19. Força e função muscular in vivo.	43
5.20. Função muscular esquelética ex vivo	44
5.21. Determinação da expressão de proteínas relacionadas a síntese e degradação proteica por Western Blot.....	45
5.22. Hematoxilina e Eosina	47
6. ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	47
7. RESULTADOS (estratégia 1).....	48
7.1. O modelo de treinamento pela caixa de força leva a perda de massa muscular, o treinamento não atenua os efeitos negativos da restrição alimentar.....	48
8. RESULTADOS (estratégia 2).....	51
8.1. A inoculação da célula tumoral Walker 256 causa mortalidade, atrofia e perda de função muscular em ratos Wistar.....	51
8.2. A inoculação da célula tumoral Walker 256 causa anorexia e afeta a produção de citocinas pró-inflamatórias.....	53
9. RESULTADOS (estratégia 3).....	54
9.1. Treinamento de força não foi capaz de atenuar a atrofia muscular induzida pelo tumor, mas trouxe uma modesta mudança na sinalização metabólica e proteica. ...	54
9.2. Treinamento de força não atenua a perda da função muscular, o crescimento tumoral e não aumenta a sobrevida dos animais, mas a perda da força é um preditor da mortalidade pelo câncer.	62
9.3. Alto volume e intensidade de treinamento aumentam a força dos animais em curto período de tempo.	66
10. DISCUSSÃO.....	67
11. CONCLUSÃO	72
12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73

1. INTRODUÇÃO

O câncer é caracterizado como uma mutação celular que causa crescimento celular anormal, resultando no aparecimento de um tumor. Em função de promover seu crescimento e proliferação, a presença desta patologia gera no organismo uma disfunção metabólica. Não obstante, a etiologia dessa doença é complexa e multifatorial, de modo a dificultar a identificação da sua causa (Fearon *et al.*, 2011). As estimativas epidemiológicas indicam que no ano de 2020 cerca de 22 milhões de novos casos serão diagnosticados, resultando em aproximadamente 12 milhões de mortes como consequência direta do câncer (Cancer, 2014). Atualmente, ela é a segunda maior causa de morte no mundo e a dificuldade no seu tratamento é evidente (Manton, Akushevich e Kravchenco, 2009; Jemal *et al.*, 2011; Siegel *et al.*, 2011). No Brasil, foram diagnosticados 576 mil casos no ano de 2014, valor que representa mais de 4% do total de casos no mundo, de modo que a cada três casos diagnosticados um resulta em óbito (Inca, 2014).

Mais de 25% das mortes são consequências diretas da caquexia induzida pelo câncer. A caquexia pode ser definida como uma síndrome metabólica multifatorial caracterizada por perda acentuada do músculo esquelético, acompanhada ou não de perda de tecido adiposo (Tisdale, 2009; Fearon, 2011). A proteólise exacerbada advinda desse quadro envolve principalmente proteínas essenciais do músculo esquelético (miosina e actina), proteínas estas que estão envolvidas no processo de contração (Acharyya *et al.*, 2004; Du *et al.*, 2004). Consequentemente, esse quadro resulta em fadiga e perda de função muscular, bem como em um quadro de imobilidade. Nos

casos mais graves de caquexia os pacientes chegam a perder até 30% da massa corporal, culminando em uma perda de até 75% das proteínas musculares e óbito súbito do paciente (Tisdale, 2005).

O quadro atrófico é consequência de um desequilíbrio no *turnover* proteico, ou seja, um aumento de vias de proteólise associado ou não a diminuição das vias de síntese proteica. Embora a anorexia apresente grande contribuição para esse desbalanço, a atrofia em pacientes caquéticos não é exclusivamente atribuída a esse fator. Haja vista que Deuster, Morrison e Ahrens, (1985) demonstram que ratos saudáveis submetidos a restrição alimentar com o objetivo de parear o seu consumo ao de ratos inoculados com o tumor Walker 256, apresentaram maior síntese proteica associada a uma menor proteólise quando comparados aos ratos inoculados com o tumor. Assim, a atrofia parece ser resultado de um somatório de fatores oriundos da presença do tumor. Entre eles, podemos destacar a inflamação sistêmica (Lira *et al.*, 2010) a resistência à insulina (Tayek, 1992; Argilés, Alvarez e López-Soriano, 1997) e o estresse oxidativo (Guarnier *et al.*, 2010). Em conjunto, esses fatores colaboram para a hiperativação de sistemas proteolíticos e/ou inibição das vias de síntese proteica.

Nesse contexto, destacamos a contribuição do sistema ubiquitina-proteassoma como a principal via proteolítica. O sistema ubiquitina-proteassoma apresenta função ímpar marcando e degradando proteínas alvo no citosol. De forma resumida, uma enzima conhecida como E1(ativadora da ubiquitina) ativa a ubiquitina, a E2(conjugadora da ubiquitina) conjuga as ubiquitinas em cadeias de poliubiquitinas e, posteriormente a E3 (ligadora da

ubiquitina) liga as ubiquitinas em uma proteína alvo. Uma vez marcada, essa proteína pode ser reconhecida e degradada pelo proteassoma (Glickman e Ciechanover, 2002). O proteassoma é constituído por uma porção central denominada 20S ligada a duas extremidades laterais (19S). Enquanto as extremidades 19S regulam o sistema, a porção 20S é responsável pela ação catalítica em si (Lecker *et al.*, 2004). Esse sistema é responsável por grande parte da degradação de proteínas musculares e interessante, é observado a hiperativação do mesmo em pacientes com doenças sistêmicas como câncer e insuficiência cardíaca (Bossola *et al.*, 2003; Khal *et al.*, 2005).

Paralelamente, nos deparamos com uma redução da síntese proteica (Tisdale, 2005). É sabido que o hormônio IGF-1 (Insulin Growth Factor-1) é um importante hormônio liberado em resposta ao hormônio de crescimento GH e participa no processo de síntese proteica, ativando uma via que passa pela proteína Akt (*i.e.* Akt-1, no caso do músculo esquelético, *V-Akt murine thymoma viral oncogene homolog*) e depois por uma proteína central responsável pelo crescimento celular chamada *mammalian target of rapamycin* (mTOR). Essa proteína tem papel fundamental no controle dos processos de transcrição e tradução da síntese proteica (Hay e Sonenberg, 2004; Mayer e Grummt, 2006; Zanchi e Lancha, 2008) por meio de efetores como a proteína ribossomal S6 quinase (P70^{S6k}) e a proteína inibidora da tradução da síntese proteica 4E-BP1 (proteína 1 ligante do complexo eucariótico 4e). Quando fosforilado o primeiro dos efetores ativa e o segundo desinibe o processo de síntese proteica, favorecendo principalmente a etapa de tradução (Deldicque, Theisen e Francaux, 2005).

Não obstante, fatores de transcrição apresentam uma participação ímpar nesse processo. Entre eles, podemos destacar o FoxO-3A (Forkhead box O3) e o NFkB (factor nuclear kappa B), que promovem transcrição das E3 ligases no músculo esquelético. A Figura 1 ilustra resumidamente como o tumor pode afetar a sinalização das vias de síntese e degradação proteicas mencionadas até aqui, bem como o possível *cross-talk* entre elas.

Figura 1 - Contribuição de importantes vias de síntese e degradação proteica durante o processo de atrofia muscular induzida pelo câncer.

Estratégias capazes de modular as vias de síntese e/ou degradação proteica são de grande relevância no tratamento da caquexia induzida pelo câncer. Vale ressaltar ainda que os tratamentos como cirurgias, radioterapia e quimioterapia existentes para o câncer são por vezes agressivos não apenas às células tumorais, mas também às células saudáveis como as fibras

musculares (Schneider, Dennehy e Carter, 2003). Em conjunto, esses dados reforçam a importância de estratégias alternativas capazes de influenciar positivamente no balanço proteico do músculo esquelético. Dentre as não farmacológicas, destacamos os potenciais efeitos do treinamento físico.

A literatura vem demonstrando constantemente os efeitos terapêuticos do treinamento físico em doenças crônico-degenerativas, tais como hipertensão, *diabetes mellitus* do tipo II, obesidade, osteoporose, fibromialgia e câncer (Booth *et al.*, 2002; Knowler *et al.*, 2002; Pedersen e Saltin, 2006; Handschin e Spiegelman, 2008). Especificamente no câncer, estudos demonstraram que a prática de exercícios físicos aeróbios em intensidade moderada promove melhora na capacidade física e na qualidade de vida desses pacientes (Knols *et al.*, 2005; Schmitz *et al.*, 2005). Sendo assim, a American Cancer Society sugere uma importante ação do treinamento físico aeróbio como terapia coadjuvante no tratamento do câncer. Principalmente atenuando a fadiga e a perda de massa muscular dos pacientes, bem como melhorando a qualidade de vida (Doyle *et al.*, 2006). Adicionalmente, o exercício físico está associado a um efeito protetor da citotoxicidade proveniente de quimioterápicos (Nieman *et al.*, 1995; Lien *et al.*, 2015). Além do treinamento aeróbio, destacamos os potenciais efeitos terapêuticos do treinamento de força. É sabido que o treinamento de força proporciona diversas adaptações metabólicas e hemodinâmicas no organismo, tais como a redução da gordura abdominal, melhoras nas concentrações de triglicérides no plasma, aumento do HDL-c (High Density Lipoprotein-Colesterol), controle glicêmico, aumento na translocação de GLUT 4 (transportador de glicose tipo 4), melhora

na sensibilidade à insulina, aumento da taxa metabólica de repouso e na densidade mineral óssea (Westcott, 2012). Além disso, o treinamento de força aumenta a massa muscular e a força muscular máxima, podendo também atenuar quadros de atrofia muscular, tais como no caso da sarcopenia pelo envelhecimento (Umpierre e Stein, 2007).

Desse modo, alguns estudos vêm sendo conduzidos com o objetivo de diminuir os impactos negativos no câncer em pacientes em tratamento. Segal *et al.*, (2003) encontraram diminuição da fadiga e aumento da qualidade de vida em pacientes com câncer em terapia hormonal e treinados em força. O treinamento consistiu em duas séries com doze repetições, três vezes por semana durante doze semanas, utilizando-se de doze exercícios para contemplar todos os grupos musculares. Colaborando, em crianças com leucemia o treinamento de força (oito semanas) ou treinamento combinado (16 semanas de força e 20 semanas de aeróbio) também aumentaram a força e a potência aeróbia, resultando na melhora da mobilidade funcional (San Juan, Fleck, Chamorro-Viña, Maté-Muñoz, Moral, García-Castro, *et al.*, 2007; San Juan, Fleck, Chamorro-Viña, Maté-Muñoz, Moral, Pérez, *et al.*, 2007).

Além disso, modelos animais com inoculação de tumor estão sendo amplamente utilizados para avaliar os efeitos do treinamento físico aeróbio sobre a caquexia induzida pelo câncer e seus mecanismos. Dentre eles, destacamos o modelo de células tumorais Walker 256. Em 1962 Hoffman *et al.*, observaram diminuição do crescimento tumoral em ratos inoculados com este tipo de tumor após treinamento aeróbio. Deuster, Morrison e Ahrens, (1985) demonstraram que o treinamento físico aeróbio moderado reduziu a perda de

peso e o conteúdo proteico de ratos nas primeiras semanas após a inoculação do tumor Walker 256. No mesmo modelo experimental, Bacurau *et al.*, (2000); Bacurau *et al.*, (2007) demonstraram que o treinamento físico aeróbio realizado em intensidade moderada ou em alta intensidade foram capazes de melhorar o funcionamento do sistema imune e aumentar a sobrevida dos animais portadores de tumor.

Embora existam estudos clínicos demonstrando melhora na qualidade de vida dos pacientes com câncer, ainda é limitado o conhecimento acerca dos mecanismos envolvidos nas adaptações ao treinamento de força durante o processo de caquexia induzida por esta doença. Diante da importância da função muscular para a qualidade e expectativa de vida, o maior aprofundamento nos mecanismos envolvidos no processo de atrofia muscular do câncer passa a ser de grande relevância. Hipoteticamente, o treinamento de força poderia influenciar na massa muscular de maneira fisiológica por meio da modulação direta (mecanotransdução) ou indireta, principalmente pela ativação da via do IGF-1/Akt/mTOR (Deldicque, Theisen e Francaux, 2005). Não obstante, uma maior ativação da proteína Akt inibe o fator de transcrição FoxO3a (Figura 1), atenuando a exacerbada ativação do sistema ubiquitina-proteassoma (Mascher *et al.*, 2008). Entretanto, os efeitos do treinamento de força em modelos experimentais de caquexia induzida pelo câncer, ainda são desconhecidos e não existem estudos pré-clínicos, bem caracterizados que nos trazem informações acerca do impacto deste tipo de exercício nesse quadro atrófico.

Diante do exposto, estudar os efeitos do treinamento de força nos mecanismos moleculares de síntese e degradação proteica do músculo esquelético, bem como no desenvolvimento do tumor e na sobrevivência de ratos com caquexia induzida pelo câncer é de grande relevância científica.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Câncer e caquexia

O Câncer é uma doença milenar relatada séculos antes de Cristo pelos povos egípcios, persas e indianos como um tumor maligno. Somente com o avanço da medicina se tornou possível entender e iniciar de fato o combate contra esta doença. Caracterizado como crescimento celular anormal e descontrolado, o câncer é uma doença multicausal, na qual diferentes fatores podem estar associados à sua etiologia, tais como defeitos genéticos, exposição à radiação e a poluição, hereditariedade, consumo de álcool e tabaco, má alimentação, estresse, obesidade e inatividade física (Anand *et al.*, 2008; Cancer, 2014; Who, 2014). A gênese de tumores em humanos ocorre em um processo de várias etapas no qual diferentes mutações refletem em alterações de células normais em células malignas, de modo que o câncer é um processo formado por duas ou mais mutações gerando um tumor (Hanahan e Weinberg, 2000; 2011).

A célula cancerígena que surge a partir desse processo desenvolve algumas características principais importantes para sua sobrevivência, manutenção e proliferação, que são conhecidas como *hallmarks*. Resistência à

morte celular, promoção da angiogênese na região peritumoral, defesa contra supressores de crescimento, ativação de invasão e metástase, sustentação de sinalização para proliferação, habilidade de regulação energética, produção de anticorpos contra o sistema imune, entre outros, fazem parte dessas características e em conjunto com a instabilidade genética aumentam a resistência da célula contra diferentes tipos de tratamentos e tornam o manejo dessa doença ainda mais complexo.

É devido a sua complexa etiologia e manejo clínico que os números de casos no mundo têm aumentado drasticamente. Até o ano de 2020 teremos um aumento aproximando-se de 50% nos casos de câncer chegando a mais de 22 milhões de diagnósticos, comparando com 12 milhões de casos em 2012. Nesse contexto esta doença poderá levar ao óbito cerca de 12 milhões de pessoas. Já considerada como o maior problema de saúde pública em países em desenvolvimento, no Brasil em cada três casos diagnosticados da doença um acarreta na morte do paciente e alarmantemente os casos em nosso país representam mais de 4% do total de casos no mundo (Inca, 2014; Who, 2014).

Uma complexa síndrome denominada caquexia está associada ao câncer, acometendo aproximadamente 30% dos pacientes, aumenta a morbidade, diminui a qualidade de vida e é responsável por mais de 25% das mortes (Tisdale, 2009). A caquexia é caracterizada como uma síndrome metabólica multifatorial que acarreta na perda de massa muscular acompanhada ou não de perda de tecido adiposo. A atrofia advinda do quadro de caquexia é influenciada por diferentes fatores, tais como diminuição do consumo alimentar, aumento do gasto energético basal, resistência à insulina,

inflamação e estresse oxidativo exacerbado e hipogonadismo. (Suzuki *et al.*, 2013).

A literatura ainda não é assertiva sobre o fator principal que leva a atrofia no quadro de caquexia do câncer, sendo que alguns autores afirmam que nesse contexto o processo atrófico atua principalmente pelo aumento da proteólise, enquanto outros afirmam que ocorre diminuição acentuada da síntese proteica e/ou a associação de ambos (Tisdale, 2005; 2009; Fearon, 2011). De certo, independentemente da via principal pela qual o quadro de caquexia leva a atrofia muscular esquelética, os fatores catabólicos clássicos como FOXO-1, NFK-b, Murf-1, Atrogin-1, PIF estão envolvidos, assim como os fatores anabólicos IGF-1, AKT, mTOR, entre outros (Tisdale, 2009).

Visto que é uma síndrome complexa, geralmente estratégias de tratamento multimodal são utilizadas no combate à caquexia induzida pelo câncer, para em conjunto diminuir os impactos negativos de morbidade e mortalidade que esse quadro traz aos pacientes. O tratamento nutricional vem sendo empregado com sucesso para aumentar o aporte de nutrientes do paciente, em conjunto com drogas que induzem o aumento do apetite e/ou acometem a inflamação. Além disso o exercício físico também vem trazendo resultados contundentes como um adjuvante para melhora da qualidade de vida nos pacientes caquéticos (Laviano *et al.*, 2005; Dodson *et al.*, 2011; Madeddu, Maccio e Mantovani, 2012).

2.2. Câncer e exercício

Recentemente o exercício físico vem despontando como uma excelente

alternativa adjuvante para o tratamento do câncer, combatendo a caquexia e também atuando diretamente no tumor. Estudos em modelos animais demonstram efeito direto no tumor e/ou na tumorigenesis e na metástase. Nesse sentido Davis *et al.*, (1998) demonstram efeito do exercício aeróbio na diminuição dos focos de tumores pulmonares de camundongos inoculados com células tumorais de melanoma B16 e aumento da citotoxicidade de macrófagos, mostrando efeito do exercício aeróbio na metástase. Corroborando Pettan-Brewer, Goh e Ladiges, (2014), mostraram que o mesmo tipo de exercício foi capaz de afetar as células do estroma do tumor, sendo essas células essenciais para a manutenção de metástase e invasão dos tumores. Além disso, De Lima *et al.*, (2011) demonstraram que o exercício físico anaeróbico quando iniciado antes da inoculação de um tumor de Walker 256 foi eficiente para retardar o crescimento tumoral, aumentar a apoptose e diminuir a proliferação tumoral.

No ponto de vista dos efeitos metabólicos, Donatto *et al.*, (2013) trazem achados importantes, demonstrando que o treinamento de força de 8 semanas proporciona implicações positivas em ratos inoculados com o mesmo tumor, diminuindo a inflamação e melhorando o perfil lipídico dos animais portadores de tumor de Walker 256. Esses efeitos metabólicos também são encontrados em humanos portadores de tumores, visto que Hvid *et al.*, (2013), verificaram diminuição da gordura total e visceral, aumento da sensibilidade periférica à insulina, assim como aumento do conteúdo total de GLUT4 e da proteína Akt, quando submetidos ao exercício aeróbio intervalado (55-75% do VO₂max) por 12 semanas.

Embora os achados sobre efeito do exercício físico no tumor sejam de grande importância, a maioria das intervenções em pacientes com câncer têm o objetivo principal de atuar diretamente nos efeitos da caquexia, no que diz respeito a perda funcional e fadiga causada por ela. Nesse sentido, diferentes estudos clínicos vêm sendo conduzidos utilizando o exercício físico como um adjuvante no tratamento (Jankowski *et al.*, 2014) encontrando benefícios principalmente na melhora da qualidade de vida dos pacientes.

Podemos observar que os primeiros estudos clínicos utilizando o exercício físico no câncer tiveram como objetivo diminuir os impactos negativos proporcionados pelo tratamento convencional. Em 1994 Mock *et al.*, observaram que um programa de treinamento físico utilizando caminhada, foi capaz de atenuar os efeitos negativos físicos e psicológicos do tratamento de quimioterapia. No mesmo sentido, Dimeo *et al.*, (1997) demonstram que o exercício aeróbio por 7 semanas foi capaz de diminuir a fadiga, aumentar a performance e a hemoglobina circulante de pacientes após tratamento de quimioterapia. Desse modo, com o passar dos anos, a literatura vem sendo capaz de evidenciar cada vez mais, os efeitos positivos do treinamento físico aeróbio e de força em diferentes variáveis, em pacientes durante e/ou após o tratamento de câncer. Ao passo que, são encontrados efeitos do exercício físico aeróbio em pacientes oncológicos na formação e manutenção da massa óssea (Irwin *et al.*, 2009; Peppone *et al.*, 2010), na melhora da insônia e fadiga (Coleman *et al.*, 2012; Banzer *et al.*, 2014), na melhora da resistência à insulina e inflamação (Lee *et al.*, 2013), na diminuição de gordura corporal e aumento de massa livre de gordura (Irwin *et al.*, 2009), no aumento do VO₂pico (Banzer

et al., 2014), entre outros.

Da mesma forma, efeitos benéficos são encontrados na literatura acerca do treinamento de força nesses pacientes. Sendo evidenciado que o treinamento de força não causa efeitos adversos em pacientes com câncer em estágio avançado, além de melhorar a mobilidade funcional (Litterini *et al.*, 2013). Outros benefícios principais observados com intervenções de treinamento de força em pacientes com diferentes tipos de câncer são: aumento de massa magra (Lønbro *et al.*, 2013; Cormie *et al.*, 2014), aumento de força (Lønbro *et al.*, 2013; Jensen *et al.*, 2014), melhora da qualidade de vida (Lønbro *et al.*, 2013), aumento do nível de atividade física (Cormie *et al.*, 2014; Jensen *et al.*, 2014), diminuição da fadiga (Jensen *et al.*, 2014), aumento da duração do sono (Jensen *et al.*, 2014) entre outros. Demonstrando esse conjunto de resultados que o treinamento de força já é uma realidade como adjuvante no tratamento do câncer.

2.3. Treinamento de força

O treinamento de força há tempos é utilizado com objetivo principal de obter ganhos na performance, aumento de força e massa magra, de modo que já é bem estabelecido na literatura a sua capacidade em potencializar estas variáveis. Entretanto, seu valor como treinamento capaz de influenciar na vida dos indivíduos que o utilizam, não fica limitado somente a estas características. De forma que, podemos perceber o papel desse tipo de treinamento em diferentes fatores, melhorando a qualidade de vida de indivíduos saudáveis, mas principalmente naqueles acometidos por quadros patológicos, tais como

hipertensão (Nascimento *et al.*, 2014), diabetes (Strasser e Pesta, 2013), sarcopenia (Mayer *et al.*, 2011) osteopenia e/ou osteoporose (Mosti *et al.*, 2013) e etc.

O treinamento de força não somente causa melhoras em diferentes doenças via aumento de massa muscular, como também interferindo diretamente nas vias metabólicas acometidas pela doença. Nesse tocante, podemos observar um efeito desse tipo de treinamento diretamente no metabolismo de glicose/insulina de pacientes acometidos com diabetes mellitus do tipo II em um trabalho conduzido por (Holten *et al.*, 2004), no qual os pacientes foram submetidos a seis semanas de treinamento de força de membros inferiores e após biopsia foi observado um aumento de conteúdo de Glut4, aumento de receptor de insulina e aumento de conteúdo e atividade da enzima glicogênio sintase.

Em relação a hipertensão, os mecanismos pelos quais o treinamento de força pode trazer benefícios para os pacientes, também não são associados diretamente ao aumento de massa muscular e ganhos de força. De modo que o treinamento atua na diminuição da pressão sistólica e diastólica e da pressão arterial média, assim como na liberação de fatores vasoativos e aumento da sensibilidade dos barorreflexos (Moraes *et al.*, 2012; Nascimento *et al.*, 2014). Além disso, existem outras variáveis metabólicas que podem ser afetadas pelo treinamento de força e que podem influenciar em diferentes quadros patológicos, tais como a inflamação e o estresse oxidativo (Azizbeigi *et al.*, 2013).

Interessantemente, percebemos o treinamento de força como uma

estratégia capaz de proporcionar diferentes efeitos no organismo dos indivíduos como um todo, sendo estes, metabólicos, funcionais e estruturais. Além disso, como classicamente demonstrado o treinamento de força pode atuar na musculatura esquelética de forma a proporcionar o aumento da síntese de proteínas principalmente pela ativação da via PI3k-Akt-mTOR. Mais recentemente também tem sido observado efeitos na via do proteassoma e autofagia, sendo essas vias de proteólises (Fry *et al.*, 2013; Murton e Greenhaff, 2013; Stefanetti *et al.*, 2015).

Todo esse contexto demonstra claramente que o treinamento de força por proporcionar efeitos sistêmicos e específicos na musculatura esquelética, pode ser um efetivo tratamento para atrofia muscular advinda da caquexia do câncer. Todavia, não são encontrados na literatura trabalhos pré-clínicos que verifiquem seus efeitos e seus mecanismos no contexto da caquexia. De modo que este trabalho pode trazer achados importantes nesse contexto, contribuindo para o entendimento desse quadro e para futuros *clinical trials*.

3. JUSTIFICATIVA

A perda de massa muscular oriunda da caquexia está diretamente relacionada com a sobrevida do paciente com câncer e não existe um tratamento eficaz para esse quadro. O treinamento de força como um tratamento adjuvante emergente e com grandes benefícios já demonstrados na literatura, aparece como uma estratégia capaz de atenuar os malefícios causados pelo câncer no contexto muscular. Entender os mecanismos que

levam o treinamento atuar no quadro de caquexia diminuindo a atrofia muscular, relacionados à síntese e degradação de proteínas é de inteira relevância para o futuro do tratamento desta complexa síndrome.

Nossa hipótese é que o treinamento de força iniciado após a inoculação do tumor, tenha capacidade de diminuir o efeito da caquexia do câncer; melhorando função muscular, aumentando a ativação das vias de síntese proteica, diminuindo a atividade da via proteolítica do sistema ubiquitina-proteassoma e autofagia, consequentemente atenuando a atrofia muscular.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral

O objetivo do presente estudo foi verificar os efeitos do treinamento de força na musculatura esquelética e na sobrevida de animais inoculados com tumor de Walker 256.

4.2. Estratégias Experimentais

- 1) Testar e padronizar o uso do modelo de treinamento de força em um novo protocolo chamado de caixa de força, (estratégia 1).
- 2) Padronizar um modelo de inoculação de tumor capaz de induzir atrofia muscular e caquexia do câncer (estratégia 2).

3) Avaliar os efeitos do treinamento de força na musculatura esquelética de ratos com caquexia e atrofia muscular induzida pelo câncer, nas seguintes variáveis (estratégia 3):

- a) Função muscular (*in vivo* e *ex vivo*) e morfologia da musculatura esquelética.
- b) Proteínas de via de síntese proteica (Akt-1, mTOR, p706k, 4EBP-1).
- c) Proteínas de degradação proteica (MuRF-1, Atrogin-1, LC3 e p62) e atividade da porção 20s do sistema proteolítico ubiquitina proteassoma.
- d) Proteínas do metabolismo (COX IV, CK, LDH), enzimas envolvidas no metabolismo (Citrato sintase e LDH) e lactato plasmático.
- e) Sobrevida e consumo alimentar.

5. MÉTODOS

5.1. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

Os estudos propostos foram aprovados pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo sob o protocolo 2013/02.

5.2. Protocolo experimental (estratégia 1 caixa de força)

Para avaliar o modelo de treinamento de força publicado previamente por nosso grupo utilizamos a seguinte estratégia: A amostra foi composta por 33 ratos Wistar machos com massa corporal de 250-400 gramas. Os animais foram alocados no biotério do Laboratório de Nutrição e Metabolismo Aplicados à Atividade Motora da Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo (EEFE-USP). Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas (três ou quatro animais por caixa), a uma temperatura ambiente de 22° a 24° C e em ciclo de 12 horas (claro/escuro invertido). Água e ração foram oferecidas *ad libitum*, sendo a ração normoproteica (12% de proteínas). O estudo foi dividido em duas fases. Na fase 1 os animais foram randomizados em três grupos experimentais, sendo estes: controle sedentário (controle; n = 6), sedentário com restrição alimentar (restrição; n = 6) e grupo treinado com restrição (T + restrição; n = 6). O consumo de ração, a massa corporal e massa do músculo EDL foi avaliada nestes grupos. Na fase 2 os animais foram divididos também em três grupos experimentais. A saber: controle sedentário (controle; n = 5), sedentário com restrição alimentar (restrição; n = 5) e grupo treinado com restrição (T + restrição; n = 5). O consumo de ração, a massa corporal e massa dos músculos sóleo e EDL, a área de secção transversa do músculo EDL e teste de função muscular *in vivo* foram avaliadas nesta segunda fase. Na fase 1 os animais foram submetidos a um período de adaptação ao treinamento de força na caixa de força e eutanasiados ao término deste período, já na fase 2 os animais passaram ainda por um período de 14 sessões de treinamento de força após a adaptação ao mesmo e então foram eutanasiados.

5.3. Adaptação e treinamento de força

O treinamento de força foi realizado utilizando o aparato de força publicado por (Nicastro *et al.*, 2012) e o protocolo foi adaptado dos autores. Como mostrado na tabela 1 o protocolo consiste em diferentes fases para adaptação, para então iniciar o treinamento. As etapas são denominadas *magazine*, *nose poke 1*, *nose poke 2*, *standing 1*, *standing 2*, *lifting 1* e *lifting 2* (Tabela 1). Cada sessão de treinamento foi intercalada por 48-72h de intervalo. Os animais foram submetidos a 24h de restrição alimentar antes de cada sessão de adaptação e durante o treinamento e então a ração era ofertada *ad libitum* nas 24-48h seguintes a sessão de exercício.

Tabela 1. FASE 1: período de adaptação (~ 3 semanas).

Etapas	Nº de sessões	Nº de repetições/sessão	Carga (g)
Magazine	1	30	0
Nose poke 1	1	30	0
Nose poke 2	2	30	0
Standing 1	2	30	0
Standing 2	2	30	0
Lifting	1	30	0
Lifting	1	30	50% Peso corporal
FASE 2: período de adaptação e treinamento (~ 8 semanas).			
Magazine	1	30	0
Nose poke 1	1	30	0
Nose poke 2	2	30	0
Standing 1	2	30	0
Standing 2	2	30	0
Lifting	2	30	0
Lifting	14	30	50% Peso corporal

5.4. Consumo alimentar e massa muscular e corporal

O consumo alimentar foi registrado diariamente assim como a massa corporal. Eram colocados 300g de ração por dia em cada caixa dos animais, então 24h depois a sobra da ração era pesada em uma balança calibrada (GEHAKA LTDA) para então fazermos o cálculo do consumo de ração dos animais nas 24h posteriores. No mesmo momento cada animal era pesado para averiguação da massa corporal. Após a eutanásia o musculo EDL e sóleo dos animais foram removidos cuidadosamente e pesados em balança de precisão (GEHAKA LTDA).

5.5. Função muscular relacionada a coordenação motora (*in vivo*)

Função muscular relacionada a coordenação motora foi avaliada pelo teste de deambulação (Carter, Morton e Dunnett, 2001). Esse teste consiste em colocar as patas traseiras dos animais em contato com tinta preta não tóxica e em seguida posiciona-los para caminhar por uma caixa retangular de madeira sem teto e forrada com papel branco por duas tentativas. O comprimento das passadas foi aferido e expresso em centímetros. A média das passadas das duas tentativas foi considerada para as comparações. O teste deambulação possui uma elevada correlação com a força muscular e coordenação motora. Também utilizamos o teste *Rotarod* que determina o tempo que cada animal permanece sobre uma roda giratória. O equipamento (AVS, Brasil) foi programado para iniciar em uma velocidade de 1rpm

aumentando até a velocidade de 40rpm em um período de 300 segundos. São executadas três tentativas e o tempo que cada animal permanece na roda giratória é computado, sendo utilizado o melhor tempo de cada animal (Bueno *et al.*, 2010).

5.6. Histoquímica pela atividade da ATPase

Uma amostra do músculo esquelético EDL foi cuidadosamente removida, fixado em uma massa de montagem à base de Tissue-Tek® e rapidamente congelada em isopentano resfriado em nitrogênio líquido. Então, realizamos cortes de 10 µm para executar a reação adaptada de (Brooke e Kaiser, 1970), que permitiu a avaliação da enzima miosina ATPase por meio de soluções com diferentes pH (4,3 e 10,3), com o intuito da determinação do fenótipo de fibras e área de secção transversa.

A captura das imagens foi realizada com amplificação de 200x em objetiva de 20x. A aquisição das imagens foi processada em computador acoplado a um sistema de vídeo por meio de um programa de imagens (Leica Qwin, Leica Microsystems, Alemanha). Foram analisados de 4 a 7 campos de cada corte histológico, na tentativa de avaliar o tecido por inteiro e calculada a área de secção transversa em µm² através do programa ImageJ-Pro Plus.

5.7. Protocolo Experimental (estratégia 2)

A amostra foi composta por 21 ratos Wistar machos com massa corporal de ~250 gramas. Os animais foram alocados no biotério do Laboratório de

Nutrição e Metabolismo Aplicados à Atividade Motora da Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo (EEFE-USP). Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas (três ou quatro animais por caixa), a uma temperatura ambiente de 22° a 24° C e em ciclo de 12 horas (claro/escuro invertido). Água e ração foram oferecidas *ad libitum*, sendo a ração normoproteica (12% de proteínas). Os animais foram randomizados e divididos em dois grupos sendo: grupo controle e grupo Tumor. Após adaptação e testagem de força e coordenação motora. Os animais do grupo tumor foram inoculados através de um processo cirúrgico com células Walker 256 na porção medial do úmero da pata dianteira esquerda e após 15 dias os animais foram eutanasiados para a execução das análises propostas. Quatro animais do grupo tumor foram mantidos vivos para avaliação da sobrevivência. A tabela abaixo explicita o desenho experimental.

Tabela 2. Protocolo de adaptação ao equipamento de força e desenho experimental.

Dias	Numero de Seções	Repetições por série	Carga (g)
1º	1	15	0
2º	2	12	0
3º	2	12	0
4º	1	12	100
5º	2	12	100
6º	1	12	200
7º	2	12	200
8º	-	-	-
9º	Teste 1-RM		
10º	Deambulação		
Osteotomia e injeção de células (Walker 256 ou solução saline)			
Continua			

Tabela 2. continuação

13 dpi	<i>Teste 1-RM</i>
14 dpi	<i>Deambulação</i>
15 dpi	<i>Decapitação</i>

dpi = dias após inoculação. 1-RM = uma repetição máxima.

5.8. Função muscular relacionada a coordenação motora (*in vivo*) e força (1RM)

Função muscular relacionada a coordenação motora foi avaliada pelo teste de deambulação (Carter, Morton e Dunnett, 2001). Esse teste consiste em colocar as patas traseiras dos animais em contato com tinta preta não tóxica e em seguida posiciona-los para caminhar por uma caixa retangular de madeira sem teto e forrada com papel branco por duas tentativas. O comprimento das passadas foi aferido e expresso em centímetros. A média das passadas das duas tentativas foi considerada para as comparações. O teste deambulação possui uma elevada correlação com a força muscular e coordenação motora.

O teste de força foi realizado por meio de um aparato de exercício de força utilizando o protocolo proposto por (Tamaki, Uchiyama e Nakano, 1992) e padronizado por (Barauna *et al.*, 2005). A adaptação foi realizada por 7 dias, 1x/dia. Os animais foram alocados no aparato, conforme mostrado na figura abaixo.

Figura 2. Modelo de treinamento de força. Retirada de TAMAKI et al 1992.

As patas posteriores dos animais são colocadas sobre uma placa de metal, a qual está conectada a um estimulador elétrico, assim, o animal recebe um estímulo elétrico de 5-10v, 0,3s de duração, 4s de intervalo entre as repetições. A Tabela 2, explicita o desenho experimental. Dois dias após ao último dia de adaptação foi realizado um teste de 1RM que é realizado da seguinte forma: É colocada uma anilha com aproximadamente 700g na barra de madeira do aparato de exercício de força, em seguida o animal é estimulado a realizar o exercício. Após a realização do movimento um avaliador classifica o agachamento realizado pelo animal. Essa classificação permite ao avaliador aumentar ou diminuir o peso. São realizadas de 5 a 7 tentativas subsequentes até que se possa estipular o peso que o animal suporta levantar de maneira eficiente. Entre cada tentativa o animal permanece em recuperação durante três a cinco minutos.

5.9. Inoculação do tumor

Após uma pequena incisão na porção medial da pata dianteira direita dos animais, o úmero foi exposto e perfurado com equipamento para micro perfuração (micro retífica dremel 3000), então foram injetadas 4×10^6 células do tumor Walker 256 por meio de uma pipeta de até 10 μ l, após a injeção das células a abertura foi obstruída com cola *super bonder*. Nos grupos controle foi injetado solução *phosphate buffer solution* (PBS).

5.10. Consumo alimentar e massa corporal

O consumo alimentar foi registrado diariamente assim como a massa corporal. Foi colocado 300g de ração por dia em cada caixa dos animais, então 24h depois a sobra da ração era pesada em uma balança calibrada (GEHAKA LTDA) para então fazermos o cálculo do consumo de ração dos animais nas 24h posteriores. No mesmo momento cada animal era pesado para averiguação da massa corporal.

5.11. Eutanásia e coleta de tecidos

Após a anestesia, os animais foram decapitados e os músculos Sóleo, Plantar e EDL foram cuidadosamente retirados e pesados e então imediatamente congelado em freezer -80°C. Uma porção do EDL foi congelada em isopentano resfriado em nitrogênio líquido para análise histológica.

5.12. Imunofluorescência por MHCI.

A imunofluorescência para MHCI foi realizada devido a sua grande especificidade na identificação desse tipo de fibra (Tipo I), a detecção de apenas um tipo de fibra que expressa MHCI será viável neste estudo. O músculo EDL é seccionado na espessura de 10 μm , as secções são previamente fixadas com formalina (Sigma-Aldrich, HT501128, Brasil) 10% por 10 minutos em temperatura ambiente, permeabilizadas em 0,2% de Triton X-100 (Bio-rad, 01-0407, EUA) e 1% albumina sérica bovina (BSA; Amresco, E588, EUA) diluídos em PBS (Phosphate Buffer Saline; Tampão Fosfato Salino; Sigma-Aldrich, P4417, Brasil) por 10 minutos. O bloqueio é feito em 10% de soro de cabra (Sigma-Aldrich, G9023, Brasil) em PBS por 45 minutos. As lâminas são incubadas com solução contendo os anticorpos primários contra 1) Anti-mouse MHCI (diluição 1:6000) para a diferenciação da fibra muscular do tipo I; e 2) Laminina (diluição 1:100) para a marcação de membrana e demais fibra musculares, negativas para tipo I, ou seja, fibras do tipo II; com 1,5% de soro de cabra PBS por 1h e 30 minutos em temperatura ambiente. Após a lavagem com 0,2% de Triton X-100 em PBS (3 vezes de 10 minutos cada), os cortes são incubados por 40 minutos em sala escura com uma solução PBS contendo 1,5% de goat sérum, os respectivos anticorpos secundários fluorescentes para MHCI (diluição 1:500; Alexa Fluor 568 goat anti-mouse, Life Technologies, A11004, EUA) e Laminina (diluição 1:500; Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit, Life Technologies, A11008, EUA) e Hoechst (diluição 1:1000, para visualização dos núcleos). Após 30 minutos de lavagem em 0,2% de Triton X-100 em PBS as lâminas são cobertas com lamínulas utilizando-se glicerol tamponado (60% Glicerol, 40% Tris-HCl 0.1M pH 9.3).

A captura das imagens obtidas pelas duas técnicas de coloração foi realizada com aumento de 200x e objetiva de 20x. O registro das imagens foi realizado em computador acoplado a um microscópio fluorescente e conectado a um sistema fotográfico (magnificação de 200x) (Leica Qwin, Leica Microsystems, Alemanha). A quantificação da área de secção transversa das fibras do músculo EDL foi realizada por meio do programa Image-Pro Plus. Os resultados foram expressos em μm^2 .

5.13. Análise de citocinas plasmáticas

Os níveis das citocinas foram determinados utilizando um imunoensaio com microesferas do tipo multiplex. Cinquenta microlitros das amostras foram analisadas para TNF- α , IL-10, IL-6, IL-1 β , usando um kit disponível comercialmente (Lincoplex, Millipore, Missouri, USA) em um analisador Luminex (Luminex®, MiraiBio, Alameda, CA) de acordo com as instruções do fabricante.

Resumidamente, 96-poços com filtro foram pré-umedecidos com tampão de lavagem e a solução foi aspirada dos poços usando uma sucção à vácuo (Millipore Corporation, Billerica, MA). Micro-esferas revestidas com anticorpos monoclonais contra os 4 alvos diferentes analisados foram adicionadas aos poços. Amostras e padrões (variando de 0,13 a 2.000 pg / ml para cada análise) foram pipetados nos poços e incubados durante a noite a 4°C. Os poços foram lavados e aspirados e uma mistura de anticorpos biotinilados secundários foi adicionada. Após a incubação por 1 hora, estreptavidina conjugada com a proteína fluorescente, R-ficoeritrina (estreptavidina-RPE) foi

adicionada às microesferas e incubadas por 30 minutos. Após a lavagem para remoção dos reagentes não aderidos, foi adicionada aos poços com as microesferas (mínimo de 100 por análise) uma solução tampão sheath fluid (Luminex®, MiraiBio, Alameda, CA) para serem analisadas no analisador de microesferas (Luminex 100™, Luminex®, MiraiBio, Alameda, CA). As concentrações das amostras desconhecidas (antígenos nas amostras de FG) foram estimadas a partir da curva padrão, utilizando o Bio-Plex Manager Software (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Os níveis das citocinas foram expressos como quantidade total por sítio (pg/sítio). Todas as amostras foram analisadas em duplicata.

5.14. Protocolo experimental (estratégia 3)

A amostra foi composta por 40 ratos Wistar machos com massa corporal de ~250 gramas. Os animais foram alocados no biotério do Laboratório de Nutrição e Metabolismo Aplicados à Atividade Motora da Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo (EEFE-USP). Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas (quatro ou cinco animais por caixa), a uma temperatura ambiente de 22° a 24° C e em ciclo de 12 horas (claro/escuro invertido). Água e ração foram oferecidas *ad libitum*, sendo a ração normoproteica (12% de proteínas).

Os animais foram adaptados por duas semanas no aparato de treino de força de acordo com Tamaki, Uchiyama e Nakano, (1992), após esse período de adaptação os animais foram testados em relação à deambulação e teste de força e então randomizados em 4 grupos experimentais, sendo estes: grupo

controle (Controle), grupo controle treinado saudável (Controle + T), grupo câncer sedentário (Tumor) e grupo câncer treinado (Tumor + T). Os grupos C e CT foram inoculados com 10 μ l (4×10^6) de células tumorais na região medial do úmero e um dia após esta inoculação os grupos Tumor e Tumor + T iniciaram o treinamento de força.

O treinamento consistiu em 8 sessões contendo 3x10 repetições com carga correspondente a 65% da carga máxima obtida através do teste de força, os animais iniciaram o treinamento 2 dias após a inoculação e efetuaram o treino em 2 dias com 1 dia de intervalo. O décimo terceiro e décimo quarto dia foram destinados aos testes pós de deambulação e no 15º dia os animais foram anestesiados e então decapitados para efetuarmos as análises moleculares. Durante todo período foi avaliado a massa corporal e o consumo de ração dos animais. O desenho experimental abaixo ilustra como foi conduzido o experimento.

Figura 3 – Desenho experimental

5.15. Inoculação do tumor

Após uma pequena incisão na porção medial da pata dianteira direita dos animais, o úmero foi exposto e perfurado com um equipamento de micro perfuração (micro retífica dremel 3000), então foram injetadas 4×10^6 células do tumor Walker 256 por meio de uma pipeta de até 10 μ l, após a injeção das células a abertura foi obstruída com cola *super bonder*. Nos grupos controle foi injetado solução *phosphate buffer solution* (PBS).

5.16. Consumo alimentar, massa corporal e tumoral

O consumo alimentar foi registrado diariamente em conjunto com a massa corporal. A massa do tumor foi aferida através de imagem por DXA (Dual Energy x ray absorptiometry) no décimo terceiro dia após inoculação na *facility* do CEFAP ICB. Esses valores foram colocados na seguinte fórmula para estimar o volume do tumor in vivo: Volume do tumor = $0,52 \times (\text{Maior Eixo}) \times (\text{Menor eixo})^2$ (Onuchic *et al.*, 2012).

5.17. Eutanásia e coleta de tecido

Os animais foram anestesiados e então decapitados, o músculo EDL foi cuidadosamente retirado e pesado, uma porção foi imediatamente congelado em freezer -80°C e a outra foi congelada em isopentano resfriado em nitrogênio líquido para análise histológica.

5.18. Treinamento de força

O treinamento proposto foi realizado por meio de um aparato de exercício de força adaptado de Tamaki, Uchiyama e Nakano, (1992) e padronizado por Barauna *et al.*, (2005). E está sendo melhor explicado no tópico 5.8.

5.19. Força e função muscular *in vivo*.

A força e a função foram avaliadas pelos testes de deambulação (Carter, Morton e Dunnnett, 2001) e teste de força máxima. O teste deambulação possui

uma elevada correlação com a força muscular. As patas traseiras dos animais foram colocadas em contato com tinta preta não tóxica e em seguida eles foram posicionados para caminhar por uma caixa retangular de madeira sem teto e forrada com papel branco por duas tentativas. O comprimento das passadas foi aferido e expresso em centímetros. A média das passadas das duas tentativas foi considerada para as comparações. A força máxima foi aferida conforme descrito no protocolo de treinamento de força.

5.20. Função muscular esquelética *ex vivo*

Imediatamente após a eutanásia dos animais, o músculo EDL foi cuidadosamente removido e fixado entre dois eletrodos de platina em um banho de órgãos contendo solução de Krebs-Ringer (137mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl_2 , 1 mM KH_2PO_4 , 1 mM MgSO_4 , 24 mM NaHCO_3 , 11 mM $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$; 22°C; pH 7.4) e aerada com solução carbogênica (95% O_2 - 5% CO_2). O tendão distal do músculo foi amarrado e fixado na base da cuba enquanto que o tendão proximal foi amarrado e acoplado a um transdutor de força.

Durante trinta minutos de estabilização, o comprimento ótimo de cada músculo foi avaliado a partir de estímulos elétricos (0,2ms; 80V) aplicados ao músculo com frequência de 1Hz a cada dois minutos, com incremento de 1mm de estiramento entre cada estímulo. Após a estabilização, os músculos em seus comprimentos ótimos foram avaliados quanto a sua capacidade de gerar força sendo submetidos a um protocolo de força-frequência, com pulsos (0,2ms; 80v) distribuídos aos músculos a cada três minutos em frequências crescentes (10, 20, 30, 50, 80, 100 e 150Hz) com trens de pulso de 350ms. A

força máxima registrada em cada estímulo foi avaliada. A força específica foi calculada dividindo a força absoluta pela massa do músculo em gramas.

5.21. Determinação da expressão de proteínas relacionadas a síntese e degradação proteica por Western Blot

A expressão proteica do Akt total (Cell Signaling, EUA, titulação 1:750), Akt fosforilada (Ser 473) (Cell Signaling, EUA, titulação 1:750), mTOR total (Cell Signaling, EUA, titulação 1:1000), mTOR fosforilada (ser 2448) (Cell Signaling, EUA, titulação 1:1000), P706k total (Cell Signaling, EUA, titulação 1:1000), P706k fosforilada (Thr 389) (Cell Signaling, EUA, titulação 1:1000), 4ebp-1 total (Cell Signaling, EUA, titulação 1:750), 4ebp-1 fosforilada (Thr 70) (Cell Signaling, EUA, titulação 1:200), LC3 (Cell Signaling, EUA, titulação 1:1000), p62 (Cell Signaling, EUA, titulação 1:1000), GAPDH (Cell Signaling, EUA, titulação 1:1000) Murf-1 (Santa Cruz, EUA, titulação 1:1000), Atrogin-1 total (Santa Cruz, EUA, titulação 1:200) e COX IV (Santa Cruz, EUA, titulação 1:200) foram determinadas pela técnica de Western Blotting, de acordo com os procedimentos a seguir. As amostras musculares foram imediatamente homogeneizadas em tampão de extração (150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, 0.1% Triton X100, pH 7.4). Os homogeneizados foram centrifugados por 20 minutos, a 12000 rpm em temperatura de 4°C. O sobrenadante foi utilizado para quantificar a concentração total de proteínas. Em seguida, cada amostra foi diluída em tampão Laemmli na proporção de 1:5. Trinta microgramas de proteína do sobrenadante foram submetidos à eletroforese em

gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 10%), no aparelho para minigel (Mini-Protean).

A transferência das proteínas separadas no gel foi feita eletricamente sob 110 volts para uma membrana de nitrocelulose com duração de 1 hora e 30 minutos. A ligação inespecífica de proteínas na membrana de nitrocelulose foi minimizada pela incubação destas com 10 ml de solução bloqueadora (5% de leite desnatado MOLICO®) por 1 hora e 30 minutos na temperatura ambiente. Em seguida, as mesmas foram lavadas 4 vezes por cinco minutos com TBS-T e 1 vez por dez minutos com solução TBS (solução tampão tris) para retirada do excesso de tween. As bandas existentes nas membranas incubadas foram visualizadas por fotodocumentador ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare®) pós-reação de quimiluminescência. O método da quimiluminescência consiste nos seguintes passos: após incubação da membrana com o anticorpo primário, a membrana é novamente incubada por uma hora e meia com o anticorpo anti-IgG marcado com peroxidase em solução bloqueadora (1:10000). Em seguida, as membranas são lavadas novamente três vezes com solução TBS-T para remover o excesso de anticorpo. Por fim, a imunodeteção foi realizada por meio do método de quimiluminescência de acordo com as instruções do fabricante (ECL, SuperSignal West Femto Chemiluminiscent Substrate, Thermo Scientific®). As análises quantitativas dos blots foram realizadas por meio do programa ImageJ (National Institutes of Health, EUA). Como normalizador utilizamos a proteína GAPDH e também a quantificação do rastro de proteínas por meio da coloração das membranas com s – Ponceau, conforme Romero-Calvo et al. (2010)

5.22. Hematoxilina e Eosina

O músculo EDL foi seccionado na espessura de 10 μm e colocado em lamina para histologia. As secções foram fixadas com formalina (Sigma-Aldrich, HT501128, Brasil) 10% por 10 minutos em temperatura ambiente. Então, foram lavadas em água corrente e mergulhadas em solução de Hematoxilina de Harrys por 10 min. Logo após a amostra foi mergulhada no diferenciador (90% álcool 70% - 10% ácido clorídrico, em seguida mergulhada em água destilada e mergulhada em Eosina por 5 min. Após este período a amostra foi mergulhada 10x em diferentes concentrações de álcool (70%, 80%, 90%, 95%, 100%) e mergulhada em 3 soluções de Xilol. Findo esta etapa, uma lamínula foi fixada em cada amostra por meio de entellan (Merck Millipore Corporation). O registro das imagens foi realizado em computador acoplado a um microscópio fluorescente e conectado a um sistema fotográfico (magnificação de 200x) (Leica Qwin, Leica Microsystems, Alemanha). A quantificação da área de secção transversa das fibras do músculo EDL foi realizada por meio do programa Image-Pro Plus. Os resultados foram expressos em μm^2 .

6. ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os resultados foram apresentados em média $\pm$ erro padrão. Inicialmente, a distribuição dos dados foi testada pelo teste de *Shapiro-Wilk*. Todos os grupos foram testados através do teste de *Grubbs* para a averiguação sobre possíveis *outliers*, esses quando encontrados foram retirados da análise. Para as análises do estudo 1, utilizamos ANOVA de um

caminho. Os dados do estudo 2 foram analisados através de teste T de *students*. No caso das citocinas inflamatórias e devido a variação muito grande dos grupos e número amostral baixo, utilizamos o teste F para variância. Para as comparações do estudo 3 que foram realizadas entre os grupos controle, controle treinado, tumor e tumor treinado, utilizamos *ANOVA* de dois caminhos, sendo considerados como fatores o treinamento e a doença. Em caso de significância foi utilizado o teste de *Fischer* que é dependente de *ANOVA*. O nível de significância adotado nesse estudo será de $p < 0,05$.

7. RESULTADOS (estratégia 1)

7.1. O modelo de treinamento pela caixa de força leva a perda de massa muscular, o treinamento não atenua os efeitos negativos da restrição alimentar.

Como mostrado na tabela 1, a fase 1 do estudo teve a duração de aproximadamente três semanas. Como esperado o grupo restrição e o grupo T+restrição tiveram uma redução do consumo de ração total (-26,3%, -25,3%; respectivamente), mesmo apresentando uma tentativa de compensação no consumo de 24h (Figura 4A e B; $p < 0.001$). A restrição alimentar resultou em severa perda da massa corporal (Figura 4C; $p < 0.001$) e uma tendência a perda de massa do músculo EDL (Figura 4D; $p = 0.07$). É importante salientar que não houve diferenças entre o grupo restrição e o grupo T+restrição para todas as variáveis observadas (Figura 4A – 4D; $p > 0.05$).

Figura 4. Efeitos da restrição alimentar durante a adaptação no protocolo de treinamento de força. Soma do consumo total de ração (A), consumo de ração de 24h após o término de cada período de restrição alimentar (B), delta da massa corporal (C) e massa do músculo EDL (D) para os grupos experimentais controle, restrição e T + restrição. TF: treinamento de força. Dados apresentados em média ± erro padrão ***p < 0.001 quando comparados com o grupo controle. N = 6

O protocolo conduzido na fase 2 do estudo teve maior duração. Deste modo, não observamos diferenças entre os três grupos experimentais acerca da massa corporal (Figura 5A e 5B; $p < 0.01$). Foi possível observar perda de massa no músculo sóleo em ambos os grupos com restrição alimentar (Figura 5C; $p < 0.01$). Em contrapartida, o músculo EDL não apresentou diminuição de massa (Figura 5D; $p > 0.05$), também confirmamos a semelhança na morfologia do EDL através da análise histológica (Figura 5E; $p > 0.05$). Nenhuma diferença foi encontrada nos testes de deambulação e rotatod, sugerindo que o protocolo de treinamento não foi efetivo para promover

benefícios na função muscular *in vivo* (Figura 5F e 5G; $p > 0.05$). Finalmente, o protocolo de treinamento de força proposto foi ineficiente para promover benefícios em todas as variáveis observadas.

Figura 5. Efeitos da restrição alimentar durante todo protocolo de TF. Curso temporal da massa corporal (A), delta da massa corporal (B), massa do músculo sóleo (C), Massa do músculo EDL (D), área de seção transversa do músculo EDL (E), desempenho no teste rotarod (F) e teste de deambulação (G). Para os grupos experimentais controle, restrição e T + restrição. TF: treinamento de força. Dados apresentados em média $\pm$ erro padrão * $p < 0.05$ quando comparados com o grupo controle. NS indica que não há diferença significativa entre os grupos. N = 5

8. RESULTADOS (estratégia 2)

8.1. A inoculação da célula tumoral Walker 256 causa mortalidade, atrofia e perda de função muscular em ratos Wistar.

Esse estudo teve como foco a padronização de um modelo com mortalidade homogênea, atrofia e perda de função muscular. A mortalidade dos animais iniciou no vigésimo primeiro dia e finalizou no vigésimo quinto dia, todos os animais com tumor morreram (Figura 6A). Quando comparados com os animais controle, houve uma significativa atrofia muscular no sóleo (-20%), plantar (-22%) e EDL (-21%) dos animais com tumor (Figura 6B, 6C e 6D; $p < 0.001$). A atrofia no músculo EDL foi confirmada através da área de secção transversa (Figura 6E; $p < 0.05$), mostrando diminuição de -42% nos animais com tumor, confirmando mudança morfológica na musculatura esquelética. Também foi possível observar queda na função muscular relacionada a coordenação motora (Figura 6E; $p < 0.01$) e na força muscular medida por teste de 1RM (Figuras 6F; $p > 0.01$).

Figura 6. Indicadores de mortalidade, atrofia e perda de função muscular *in vivo* para os grupos experimentais. Sobrevida (A), massa do músculo sóleo (B; controle n = 9; tumor n=8), massa do músculo plantar (C; controle n = 9; tumor n=8), massa do músculo EDL (D; controle n = 8; tumor n=7), área de secção transversa do músculo EDL e imagens representativas (E; controle n = 8; tumor n=5), teste deambulação (F; controle n = 8; tumor n=7) e teste de 1-RM (G; controle n = 8;

tumor n=4) para os grupos experimentais controle e tumor. Dados apresentados em média $\pm$ erro padrão. * $p < 0.05$ entre grupo controle e tumor.

8.2. A inoculação da célula tumoral Walker 256 causa anorexia e afeta a produção de citocinas pró-inflamatórias.

Como esperado o grupo inoculado com tumor apresentou anorexia (Figura 7A) tendo redução significativa no consumo de ração ($p < 0.0001$). Ao mesmo tempo foi possível notar que o tumor gerou uma alteração no perfil de citosinas pró-inflamatórias circulantes (Figura 7B; $p < 0.001$. 7C; $p = 0.01$. 7D; $p < 0.04$).

Figura 7. Anorexia e marcadores de inflamação para os grupos experimentais. Consumo de ração (A), concentração de TNF-alpha plasmático (B; controle n = 8; tumor n=4), concentração de interleucina 6 plasmática (C; controle n = 7; tumor n=4), concentração de interleucina 1 beta

plasmática (D; controle n = 7; tumor n=4), para os grupos experimentais controle e tumor. Dados apresentados em média $\pm$ erro padrão. *p < 0.05 entre grupo controle e tumor.

9. RESULTADOS (estratégia 3)

9.1. Treinamento de força não foi capaz de atenuar a atrofia muscular induzida pelo tumor, mas trouxe uma modesta mudança na sinalização metabólica e proteica.

A massa corporal permaneceu similar entre os grupos (p=0.47), os animais portadores de tumor tiveram uma significativa atrofia muscular quinze dias após a inoculação, nos músculos plantar (-20,5%) e EDL (-20%) (Figura 8A e B; p < 0.001). Além disso, confirmamos a atrofia no músculo EDL através da área de secção transversa (Figura 8C e 8D; p < 0.001), mostrando diminuição de 43.8% nos animais com tumor. Após o treinamento, ambos os grupos (Controle + T e Tumor + T) tiveram menor incremento na massa corporal, todavia não foi observado mudanças na morfologia muscular (Figuras 8A-D; p > 0.05)

Figura 8. Morfologia muscular quinze dias após a inoculação das células tumorais Walker 256. Massa do músculo plantar (A), Massa do músculo EDL (B), Quantificação da área de secção transversa do músculo EDL (C) e figuras representativas (D) para os grupos experimentais controle, controle + T, tumor e tumor + T. Treinado: Treinamento de força. Dados apresentados em média $\pm$ erro padrão número de animais utilizados em cada experimento estão mostrados em cada barra. *** $p < 0.001$ entre grupos controle e grupos com tumor.

Como podemos observar na Figura 9, os animais portadores de tumor apresentaram um grande prejuízo metabólico. Destacamos o aumento dos níveis séricos de TNF- α (+59%; $p = 0.002$), aumento do lactato plasmático (Figura 9A; $p < 0.001$) e diminuição da atividade de enzima LDH (Figura 9B; $p = 0.03$) comparando-os com os animais controle. Para a nossa surpresa houve

uma tendência de aumento para a atividade da enzima citrato sintase (Figura 9C; $p = 0.06$), enquanto a expressão proteica da COX IV foi reduzida nos grupos com tumor (Figura 2E; $p = 0.02$). Não foi encontrada diferença entre os grupos controle e tumor, acerca do conteúdo proteico da LDH e CK (Figura 9D e 9F; $p > 0.05$). É importante salientar que um efeito do treinamento de força foi encontrado na expressão proteica da LDH quando utilizamos como normalizador o *ponceau staining* (Figura 9D; $p = 0.04$), sugerindo um efeito do treinamento de força nos níveis de LDH no musculo EDL. Nenhum efeito de treino foi observado nas outras variáveis metabólicas.

Figura 9. Marcadores do prejuízo metabólico quinze dias após inoculação de células tumorais Walker 256 tumor. Lactato plasmático (A) e atividade da enzima lactato desidrogenase no músculo EDL (B), atividade de enzima citrato sintase no músculo EDL (C), expressão proteica da lactato desidrogenase (D), expressão proteica do complexo mitocondrial IV (E) e expressão proteica da creatina quinase (F) para os grupos experimentais controle, controle + T, tumor e tumor + T. LDH: Lactato desidrogenase. COX IV: Complexo mitocondrial IV. CK: Creatina quinase. GAPDH: Glicerolaldeído-3-fosfato desidrogenase. Treinado: Treinamento de força. Dados apresentados em média ± erro padrão número de animais utilizados em cada experimento estão mostrados em cada barra. ***p < 0.001 entre grupos controle e grupos com tumor. *p < 0.05 para indicar comparações. n.s. indica não haver diferença significativa.

Como esperado diferentes marcadores de proteólise foram modificados nos animais com tumor. Em relação as mudanças na macro-autofagia, os níveis da proteína p62 e a razão proteínas LC3 I e II (LC3II/I) foram aumentados nos grupos com tumor, quando comparados com os animais controle (Figura 10A; e 10B; $p < 0.001$). Além disso, houve também um aumento na atividade da porção 26s do proteassoma quinze dias após a inoculação das células tumorais. (Figura 10C; $p = 0.002$). O conteúdo proteico de duas proteínas E3 ligases (Atrogin-1/MAFbx and MuRF-1) que atuam também no sistema ubiquitina proteassoma e tem participação demonstrada na atrofia muscular, foram avaliadas. Todavia não encontramos mudanças no seu conteúdo (Figura 10D; $p > 0.05$), no entanto foi possível encontrar um aumento significativo na MuRF-1 quando executamos a normalização pelo *ponceau staining* (Figura 10E; $p = 0.04$). Nenhum efeito do treinamento de força foi encontrado nos marcadores de proteólises acima citados.

Figura 10. Indicadores de proteólise muscular quinze dias após inoculação de células tumorais Walker 256. Expressão da proteína p62 no músculo EDL (A), razão LC3 II/I (B), atividade do proteassoma 26S (C), expressão da proteína Atrogin-1 (D) e MuRF-1 (E) para os grupos experimentais controle, controle + T, tumor e tumor + T. GAPDH: Gliceroldeído-3-fostato desidrogenase. Treinado: Treinamento de força. Dados apresentados em média $\pm$ erro padrão número de animais utilizados em cada experimento estão mostrados em cada barra. ***p < 0.001

entre grupos controle e grupos com tumor. * $p < 0.01$ para indicar comparações em cada gráfico. n.s. indica não haver diferença significativa.

Sabendo que a proteína Akt está envolvida em diferentes vias intracelulares, incluindo a regulação de metabolismo, progressão do ciclo celular e sobrevivência da célula, enquanto a proteína 4EBP-1 é um repressor da tradução de mRNA. Decidimos verificar seu papel nas mudanças que ocorreram entre nossos grupos experimentais, principalmente no contexto da via de sinalização para síntese proteica. Dessa forma, a Figura 11 demonstra que os grupos com tumor possuem uma diminuição dos níveis da proteína Akt associado com um aumento na fosforilação da proteína 4EBP-1 quando comparados com o grupo controle. Interessantemente o treinamento de força restaurou a fosforilação da proteína 4EBP-1 aos níveis do grupo controle (Figura 11B; $p < 0.001$). Nenhum efeito de treino foi encontrado na proteína Akt. Nenhum efeito foi encontrado nas proteínas mTOR e p70S6 no conteúdo total e fosforilado.

Figura 11. Indicadores de síntese proteica no musculo EDL quinze dias após inoculação de células tumorais Walker 256. Akt (A) 4EBP-1 (B) conteúdo total e fosforilado para os grupos controle, controle + T, tumor e tumor + T. GAPDH: Gliceroldeído-3-fostato desidrogenase. Treinado: Treinamento de força. Dados apresentados em média $\pm$ erro padrão número de animais utilizados em cada experimento estão mostrados em cada barra. *** $p < 0.001$ entre grupos controle e grupos com tumor. * $p < 0.05$ para indicar comparações em cada gráfico. # $p < 0.001$ vs. grupo tumor não treinado. n.s. indica não haver diferença significativa.

9.2. Treinamento de força não atenua a perda da função muscular, o crescimento tumoral e não aumenta a sobrevida dos animais, mas a perda da força é um preditor da mortalidade pelo câncer.

Considerando uma possível alteração na produção de força nos animais com tumor, decidimos por avaliar a função muscular *in vivo* (teste de 1RM e deambulação) e *ex vivo*. Como mostrado na Figura 12A e 12B os grupos com tumor tiveram menor desempenho em ambos os testes (1RM = -47,2%; deambulação = -69,1%), e nenhum benefício do treinamento foi encontrado. Além disso a diminuição da função muscular no músculo EDL isolado, foi observada quinze dias após a inoculação, de modo que observamos menor produção de força no teste de força e frequência e no teste de fadiga (Figura 12C e 12D) nos grupos com tumor, sem efeito positivo em relação ao treinamento. É importante salientar que, a função muscular *ex vivo* foi restaurada quando os valores foram normalizados pela massa do musculo EDL sugerindo que esta disfunção pode ser atribuída a atrofia muscular.

Figura 12. Função muscular *In vivo* e *ex vivo*. Teste de 1-RM (A) e teste deambulação (B) para os grupos controle, controle + T, tumor e tumor + T. Propriedade da Força-frequência (C) e fadiga (D) para todos os grupos experimentais. Painel da esquerda representa valores absolutos e painel da direita representa os valores normalizados pela massa do músculo. dpi: dias após a inoculação. Dados apresentados em média $\pm$ erro padrão número de animais utilizados em cada experimento estão mostrados em cada barra (n = 8 a 10 para experimentos *ex vivo*). ***p < 0.001 entre grupos controle e grupos com tumor. *p < 0.05 entre grupos controle e tumor. n.s. indica não haver diferença significativa.

Ademais, o treinamento de força não foi capaz de atenuar a anorexia, o crescimento tumoral ou a mortalidade durante a progressão da doença (Figura 13A- D). Para nossa surpresa houve uma tendência do grupo tumor + T a uma menor sobrevida quando comparado com o grupo tumor (figura 13D; p = 0.07). Por outro lado, a perda de força no teste de 1RM demonstrou uma significativa correlação negativa com a sobrevida dos animais (Figura 13E; p = 0.04), indicando que a perda da capacidade de produção de força pode predizer a mortalidade no câncer.

Figura 13. Anorexia, crescimento tumoral e mortalidade para os grupos experimentais. Consumo alimentar (A), quantificação do tamanho do tumor (B) e imagem representativa por DXA (C). Sobrevivência (D) e correlação entre sobrevivência e perda da força avaliada por teste de 1-RM (E). dpi: dias após inoculação. Dados apresentados em média $\pm$ erro padrão número de animais utilizados em cada experimento estão mostrados em cada barra ($n = 2$ para consumo alimentar e $n = 16$ para análise de sobrevivência). *** $p < 0.001$ entre grupos controle e grupos com tumor. * $p < 0.05$ entre grupos controle e tumor. n.s. indica não haver diferença significativa

9.3. Alto volume e intensidade de treinamento aumentam a força dos animais em curto período de tempo.

Depois que percebemos que a força prediz a mortalidade dos animais portadores de tumor e nosso protocolo foi ineficaz para promover o aumento de força durante o curto período (quinze dias), nós decidimos avaliar o efeito de um treinamento com grande volume e intensidade. Dois novos protocolos de treinamento de força foram aplicados em ratos saudáveis durante treze dias consecutivos. Neste protocolo os animais executaram o mesmo exercício proposto para os animais com tumor, porém a intensidade foi de 85% da força máxima obtida no teste de 1RM, além disso um grupo de animais foi submetido ao treinamento 1 vez ao dia e o outro grupo 2 vezes ao dia. Como podemos verificar na Figura 14 os animais submetidos ao treinamento 2 vezes ao dia tiveram um aumento significativo na força no curto período experimental (13 dias). Na tentativa de submeter os animais com tumor a este mesmo protocolo, verificamos que os animais não conseguem realizar este tipo de treinamento com alta intensidade a maior volume durante a progressão da caquexia do câncer.

Figura 14. Força obtida por teste de 1-RM em 1) ratos saudáveis não treinados (controle), 2) ratos submetidos ao treinamento de força em alta intensidade uma vez ao dia (1x por dia) e 3) ratos submetidos ao treinamento de força em alta intensidade duas vezes ao dia (2x por dia) para treze dias de treinamento consecutivos. Dados apresentados em média $\pm$ erro padrão número de animais utilizados em cada experimento estão mostrados em cada barra. * $p < 0.05$ vs. grupo controle.

10. DISCUSSÃO

A presente dissertação teve o objetivo de verificar os efeitos do treinamento de força na musculatura esquelética e na sobrevida de animais inoculados com tumor de Walker 256. A literatura da área tem sugerido a inclusão do exercício físico, incluindo exercício de força no tratamento multimodal da caquexia do câncer. No entanto, ainda não existem estudos suficientes que suportam a premissa de eficácia e segurança do exercício físico no tratamento de pacientes com caquexia do câncer (Fearon, 2011; Oldervoll *et al.*, 2011; Fearon, Arends e Baracos, 2013). Ao nosso conhecimento esse é o primeiro estudo pré-clínico desenhado para avaliar o impacto do treinamento de força na em um modelo de caquexia severa.

Para isso, foi necessário a condução de 3 estudos. No primeiro, nosso objetivo foi testar e padronizar um modelo de treinamento de força previamente publicado por nosso grupo e citado como um modelo qual não se faz necessário a utilização de estímulos elétricos e restrição alimentar. Entretanto, os resultados do estudo não foram reprodutíveis e para que os animais executassem o exercício proposto se fez necessário a utilização de restrição

alimentar. De modo que foi necessário avaliar a influência do período de restrição alimentar na musculatura esquelética.

De maneira geral os resultados demonstraram que a restrição alimentar severa, como a necessária para a execução do protocolo, pode causar diminuição da massa corporal e massa muscular dos animais. Embora o músculo sóleo seja conhecido por exibir menor resposta a estímulos caquéticos e ao treinamento de força (Acharyya *et al.*, 2005; Bechara *et al.*, 2014) em nosso estudo parece que a restrição alimentar a longo prazo pode leva-lo a atrofia. Ao verificarmos se o treinamento foi capaz de atenuar esta perda de massa muscular, percebemos que além do treinamento na caixa de força não atenuar este quadro atrófico ele não é capaz de modular variáveis de função muscular. De modo a ser evidente que este protocolo não poderia ser utilizado para a condução de nossos estudos futuros.

Visto que a literatura é escassa de um modelo de caquexia do câncer homogêneo em sua mortalidade e que causa de fato atrofia nos animais. Nosso segundo estudo teve o objetivo de padronizar um modelo eficiente nesse contexto. Nossos resultados foram promissores em relação a essa proposta, pois podemos demonstrar que este modelo de caquexia do câncer proposto por nosso grupo possui uma grande homogeneidade em relação a sobrevida. Além disso, comprovamos que o mesmo leva um quadro de anorexia, perda de massa muscular e corporal e ainda perda da função muscular e distúrbio metabólico, sendo este acertadamente um quadro de caquexia. Dessa forma, podemos prosseguir com nossos estudos acerca do efeito do treinamento de força neste modelo.

Para isto, um terceiro estudo foi elaborado. Embora o resultado mais promissor foi verificar que a redução na força dos animais pode prever a mortalidade durante a progressão tumoral, o protocolo de treinamento não foi efetivo para aumentar a força dos animais e atenuar a perda de massa muscular, promovendo somente módicas mudanças metabólicas ou marcadores do *turnover* proteico como por exemplo as proteínas LDH e p-4EBP1. Infelizmente os animais submetidos ao modelo de caquexia do câncer utilizado, não foram capazes de executarem um treinamento de força com alto volume e intensidade.

Como esperado, nosso modelo de caquexia do câncer causou atrofia muscular associada às mudanças metabólicas e prejuízo no *turnover* proteico, quinze dias após a inoculação do tumor. O aumento da proteína p62 e nos níveis da razão LC3II/I colaboram com outros modelos de câncer como carcinoma de cólon C26, carcinoma de pulmão (Lewis) e Hepatoma de Yoshida AH-130 (Penna *et al.*, 2013), sugerindo desregulação e aumento da autofagia durante o desenvolvimento da caquexia. Além disso, o aumento da atividade do proteassoma na porção 26s e o conteúdo proteico de MuRF-1 sugerem hiperativação do sistema ubiquitina-proteassoma. De fato, resultados similares têm sido demonstrados na atrofia muscular induzida pela insuficiência cardíaca (Cunha *et al.*, 2012). Associada a essas mudanças nas vias proteolíticas, encontramos alterações nas proteínas envolvidas na síntese proteica e em processos metabólicos. Nossos dados indicam que a injeção de células Walker 256 na medula óssea de ratos é um novo modelo de severa caquexia induzida pelo câncer.

A maior vantagem do presente modelo é a homogeneidade da mortalidade que não foi observada previamente em outros modelos. Por exemplo, temos previamente padronizado em nosso laboratório a inoculação de células de tumor Walker 256 e melanoma B16 na região subcutânea de ratos e camundongos como reportado em outros estudos (Bacurau *et al.*, 2007; Das *et al.*, 2011), mas temos observado grande variedade no crescimento tumoral e na mortalidade (dados não publicados). Neste sentido, nosso modelo possui pouca variação na maioria das variáveis analisadas quando comparado com outros tipos de inoculação de células ou xenotransplantes. Em contrapartida, a principal limitação do nosso modelo é a rápida e severa progressão, limitando a utilização de intervenções de longo período. De modo que esta é a principal razão que o treinamento de força proposto não teve efeito significativo. Desde que percebemos que a capacidade de gerar força pode prever a sobrevida, nós encorajamos outros estudos a avaliar os efeitos do treinamento de força em outros modelos de caquexia do câncer com um período de intervenção maior para desenvolver o treinamento.

O aparato de treinamento de força e o protocolo utilizado em nosso estudo 3 é bem aceito em relação a sua eficácia em promover aumento da função muscular e da força (Tamaki, Uchiyama e Nakano, 1992; Barauna *et al.*, 2005). No entanto, é necessário a utilização de estímulo elétrico para que os animais executem os movimentos o que não é coerente com o contexto fisiológico observado em humanos. Outro modelo citado na literatura como método de treinamento de força é o treinamento em escada (Matheny *et al.*, 2009; Peixinho-Pena *et al.*, 2012). Embora este treinamento não utilize o

estímulo elétrico para sua execução, a maior limitação do mesmo é a alta demanda aeróbica do exercício, descaracterizando-o como um exercício de força “puro”. Assim, outra importante limitação do estudo é falta de um modelo de treinamento robusto que mimetize o treinamento de força em humanos com todas em todas as suas variáveis.

Por fim, embora não observamos a morte ou incapacidade dos animais durante a sessão de treinamento de força, houve uma tendência ao grupo treinado diminuir a sobrevida. Considerando que nós observamos um menor ganho de massa corporal após o treinamento de força e não encontramos mudanças no crescimento tumoral e na massa muscular, o treinamento provavelmente aumentou a perda de tecido adiposo. Nós especulamos que o treinamento de força poderia acelerar a lipólise piorando a sobrevida em nosso modelo de câncer. De fato, dados recentes sugerem que a lipólise exacerbada acelera o processo de perda de massa muscular durante a progressão da doença (Das *et al.*, 2011; Petruzzelli *et al.*, 2014).

Em conjunto, temos evidências que o modelo de treinamento previamente proposto por Nicastro *et al.*, (2012) não foi reprodutivo. Ainda, a inoculação de células Walker 256 na medula óssea do úmero induz a caquexia do câncer nos ratos. Embora o treinamento de força tenha sido ineficaz para diminuir a perda muscular induzida pelo câncer, a perda de força pode prever a mortalidade dos animais. Mesmo assim, novos estudos são necessários para elucidar o papel do exercício de força e outros estímulos anabólicos no combate da caquexia do câncer e progressão tumoral. Modulando intensidade e volume de treinamento, bem como utilizando-se de estímulos nutricionais.

11. CONCLUSÃO

- O modelo de treinamento na caixa de força não foi reprodutivo.
- O modelo de câncer proposto foi eficiente para causar a atrofia muscular nos ratos inoculados, mostrando ser um modelo eficiente para o estudo da caquexia do câncer.
- O treinamento de força em animais com tumor, não foi eficiente para causar alterações na estrutura e função da musculatura esquelética dos animais treinados. Assim como, não causou nenhuma alteração estrutural, morfológica e funcional, a expressão de proteínas da via de sinalização para síntese e degradação proteica não foi modificada.
- A força possui grande correlação com a sobrevida dos animais.
- O treinamento com maior intensidade e volume é capaz de aumentar a força em animais saudáveis.

12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHARYYA, S. et al. Dystrophin glycoprotein complex dysfunction: a regulatory link between muscular dystrophy and cancer cachexia. **Cancer Cell**, v. 8, n. 5, p. 421-32, Nov 2005. ISSN 1535-6108. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16286249> >.

_____. Cancer cachexia is regulated by selective targeting of skeletal muscle gene products. **J Clin Invest**, v. 114, n. 3, p. 370-8, Aug 2004. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15286803> >.

ANAND, P. et al. Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. **Pharm Res**, v. 25, n. 9, p. 2097-116, Sep 2008. ISSN 0724-8741. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18626751> >.

ARGILÉS, J. M.; ALVAREZ, B.; LÓPEZ-SORIANO, F. J. The metabolic basis of cancer cachexia. **Med Res Rev**, v. 17, n. 5, p. 477-98, Sep 1997. ISSN 0198-6325. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9276862> >.

AZIZBEIGI, K. et al. The effect of progressive resistance training on oxidative stress and antioxidant enzyme activity in erythrocytes in untrained men. **Int J Sport Nutr Exerc Metab**, v. 23, n. 3, p. 230-8, Jun 2013. ISSN 1543-2742. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23239675> >.

BACURAU, A. V. et al. Effect of a high-intensity exercise training on the metabolism and function of macrophages and lymphocytes of walker 256 tumor bearing rats. **Exp Biol Med (Maywood)**, v. 232, n. 10, p. 1289-99, Nov 2007. ISSN 1535-3702. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17959841> >.

BACURAU, R. F. et al. Effect of a moderate intensity exercise training protocol on the metabolism of macrophages and lymphocytes of tumour-bearing rats. **Cell Biochem Funct**, v. 18, n. 4, p. 249-58, Dec 2000. ISSN 0263-6484. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11180287> >.

BANZER, W. et al. Changes in exercise capacity, quality of life and fatigue in cancer patients during an intervention. **Eur J Cancer Care (Engl)**, v. 23, n. 5, p. 624-9, Sep 2014. ISSN 1365-2354. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24724813> >.

BARAUNA, V. G. et al. Cardiovascular adaptations in rats submitted to a resistance-training model. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 32, n. 4, p. 249-54, Apr 2005. ISSN 0305-1870. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15810987> >.

BECHARA, L. R. et al. NADPH oxidase hyperactivity induces plantaris atrophy in heart failure rats. **Int J Cardiol**, v. 175, n. 3, p. 499-507, Aug 2014. ISSN 1874-1754. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25023789> >.

BOOTH, F. W. et al. Waging war on physical inactivity: using modern molecular ammunition against an ancient enemy. **J Appl Physiol (1985)**, v. 93, n. 1, p. 3-30, Jul 2002. ISSN 8750-7587. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12070181> >.

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

BROOKE, M. H.; KAISER, K. K. Muscle fiber types: how many and what kind? **Arch Neurol**, v. 23, n. 4, p. 369-79, Oct 1970. ISSN 0003-9942. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4248905> >.

BUENO, C. R. et al. Aerobic exercise training improves skeletal muscle function and Ca²⁺ handling-related protein expression in sympathetic hyperactivity-induced heart failure. **J Appl Physiol (1985)**, v. 109, n. 3, p. 702-9, Sep 2010. ISSN 1522-1601. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20595538> >.

CANCER, A. S. O. **Cancer Facts & Figures 2014**.

CARTER, R. J.; MORTON, J.; DUNNETT, S. B. Motor coordination and balance in rodents. **Curr Protoc Neurosci**, v. Chapter 8, p. Unit 8.12, Aug 2001. ISSN 1934-8576. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18428540> >.

COLEMAN, E. A. et al. Effects of exercise on fatigue, sleep, and performance: a randomized trial. **Oncol Nurs Forum**, v. 39, n. 5, p. 468-77, Sep 2012. ISSN 1538-0688. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22940511> >.

CORMIE, P. et al. Functional benefits are sustained after a program of supervised resistance exercise in cancer patients with bone metastases: longitudinal results of a pilot study. **Support Care Cancer**, v. 22, n. 6, p. 1537-48, Jun 2014. ISSN 1433-7339. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24424484> >.

CUNHA, T. F. et al. Exercise training prevents oxidative stress and ubiquitin-proteasome system overactivity and reverse skeletal muscle atrophy in heart failure. **PLoS One**, v. 7, n. 8, p. e41701, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22870245> >.

DAS, S. K. et al. Adipose triglyceride lipase contributes to cancer-associated cachexia. **Science**, v. 333, n. 6039, p. 233-8, Jul 2011. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21680814> >.

DAVIS, J. M. et al. Exercise effects on lung tumor metastases and in vitro alveolar macrophage antitumor cytotoxicity. **Am J Physiol**, v. 274, n. 5 Pt 2, p. R1454-9, May 1998. ISSN 0002-9513. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9612414> >.

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

DELDICQUE, L.; THEISEN, D.; FRANCAUX, M. Regulation of mTOR by amino acids and resistance exercise in skeletal muscle. **Eur J Appl Physiol**, v. 94, n. 1-2, p. 1-10, May 2005. ISSN 1439-6319. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15702344> >.

DEUSTER, P. A.; MORRISON, S. D.; AHRENS, R. A. Endurance exercise modifies cachexia of tumor growth in rats. **Med Sci Sports Exerc**, v. 17, n. 3, p. 385-92, Jun 1985. ISSN 0195-9131. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4021782> >.

DIMEO, F. C. et al. Aerobic exercise in the rehabilitation of cancer patients after high dose chemotherapy and autologous peripheral stem cell transplantation. **Cancer**, v. 79, n. 9, p. 1717-22, May 1997. ISSN 0008-543X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9128987> >.

DODSON, S. et al. Muscle wasting in cancer cachexia: clinical implications, diagnosis, and emerging treatment strategies. **Annu Rev Med**, v. 62, p. 265-79, 2011. ISSN 1545-326X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20731602> >.

DONATTO, F. F. et al. Resistance exercise modulates lipid plasma profile and cytokine content in the adipose tissue of tumour-bearing rats. **Cytokine**, v. 61, n. 2, p. 426-32, Feb 2013. ISSN 1096-0023. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23178146> >.

DOYLE, C. et al. Nutrition and physical activity during and after cancer treatment: an American Cancer Society guide for informed choices. **CA Cancer J Clin**, v. 56, n. 6, p. 323-53, 2006 Nov-Dec 2006. ISSN 0007-9235. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17135691> >.

DU, J. et al. Activation of caspase-3 is an initial step triggering accelerated muscle proteolysis in catabolic conditions. **J Clin Invest**, v. 113, n. 1, p. 115-23, Jan 2004. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14702115> >.

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

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

FEARON, K. C. Cancer cachexia and fat-muscle physiology. **N Engl J Med**, v. 365, n. 6, p. 565-7, Aug 2011. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21830971> >.

FRY, C. S. et al. Skeletal muscle autophagy and protein breakdown following resistance exercise are similar in younger and older adults. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, v. 68, n. 5, p. 599-607, May 2013. ISSN 1758-535X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23089333> >.

GLICKMAN, M. H.; CIECHANOVER, A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. **Physiol Rev**, v. 82, n. 2, p. 373-428, Apr 2002. ISSN 0031-9333. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11917093> >.

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

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, Jan 2000. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10647931> >.

_____. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-74, Mar 2011. ISSN 1097-4172. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21376230> >.

HANDSCHIN, C.; SPIEGELMAN, B. M. The role of exercise and PGC1alpha in inflammation and chronic disease. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 463-9, Jul 2008. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18650917> >.

HAY, N.; SONENBERG, N. Upstream and downstream of mTOR. **Genes Dev**, v. 18, n. 16, p. 1926-45, Aug 2004. ISSN 0890-9369. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15314020> >.

HOFFMAN, S. A. et al. The influence of exercise on the growth of transplanted rat tumors. **Cancer Res**, v. 22, p. 597-9, Jun 1962. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14042313> >.

HOLTEN, M. K. et al. Strength training increases insulin-mediated glucose uptake, GLUT4 content, and insulin signaling in skeletal muscle in patients with type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 53, n. 2, p. 294-305, Feb 2004. ISSN 0012-1797. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14747278> >.

HVID, T. et al. Endurance training improves insulin sensitivity and body composition in prostate cancer patients treated with androgen deprivation therapy. **Endocr Relat Cancer**, v. 20, n. 5, p. 621-32, Oct 2013. ISSN 1479-6821. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23744766> >.

INCA. Estimativa 2014 - Incidência de Câncer no Brasil 2014.

IRWIN, M. L. et al. Exercise improves body fat, lean mass, and bone mass in breast cancer survivors. **Obesity (Silver Spring)**, v. 17, n. 8, p. 1534-41, Aug 2009. ISSN 1930-7381. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19629060> >.

JANKOWSKI, C. M. et al. Searching for maintenance in exercise interventions for cancer survivors. **J Cancer Surviv**, v. 8, n. 4, p. 697-706, Dec 2014. ISSN 1932-2267. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25103605> >.

JEMAL, A. et al. Global cancer statistics. **CA Cancer J Clin**, v. 61, n. 2, p. 69-90, 2011 Mar-Apr 2011. ISSN 1542-4863. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21296855> >.

JENSEN, W. et al. Exercise training in patients with advanced gastrointestinal cancer undergoing palliative chemotherapy: a pilot study. **Support Care Cancer**, v. 22, n. 7, p. 1797-806, Jul 2014. ISSN 1433-7339. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24531742> >.

KHAL, J. et al. Increased expression of proteasome subunits in skeletal muscle of cancer patients with weight loss. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 37, n. 10, p. 2196-206, Oct 2005. ISSN 1357-2725. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16125116> >.

KNOLS, R. et al. Physical exercise in cancer patients during and after medical treatment: a systematic review of randomized and controlled clinical trials. **J Clin Oncol**, v. 23, n. 16, p. 3830-42, Jun 2005. ISSN 0732-183X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15923576> >.

KNOWLER, W. C. et al. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. **N Engl J Med**, v. 346, n. 6, p. 393-403, Feb 2002. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11832527> >.

LAVIANO, A. et al. Therapy insight: Cancer anorexia-cachexia syndrome--when all you can eat is yourself. **Nat Clin Pract Oncol**, v. 2, n. 3, p. 158-65, Mar 2005. ISSN 1743-4254. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16264909> >.

LECKER, S. H. et al. Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression. **FASEB J**, v. 18, n. 1, p. 39-51, Jan 2004. ISSN 1530-6860. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14718385> >.

LEE, D. H. et al. Effects of a 12-week home-based exercise program on the level of physical activity, insulin, and cytokines in colorectal cancer survivors: a pilot study. **Support Care Cancer**, v. 21, n. 9, p. 2537-45, Sep 2013. ISSN 1433-7339. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23636649> >.

LIEN, C. Y. et al. Short-term exercise training attenuates acute doxorubicin cardiotoxicity. **J Physiol Biochem**, Sep 2015. ISSN 1877-8755. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26403766> >.

LIRA, F. S. et al. Exercise training reduces PGE2 levels and induces recovery from steatosis in tumor-bearing rats. **Horm Metab Res**, v. 42, n. 13, p. 944-9, Dec 2010. ISSN 1439-4286. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21064006> >.

LITTERINI, A. J. et al. Differential effects of cardiovascular and resistance exercise on functional mobility in individuals with advanced cancer: a randomized trial. **Arch Phys Med Rehabil**, v. 94, n. 12, p. 2329-35, Dec 2013. ISSN 1532-821X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23810356> >.

LØNBRO, S. et al. Progressive resistance training rebuilds lean body mass in head and neck cancer patients after radiotherapy--results from the randomized DAHANCA 25B trial. **Radiother Oncol**, v. 108, n. 2, p. 314-9, Aug 2013. ISSN 1879-0887. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23932192> >.

MADEDDU, C.; MACCIO, A.; MANTOVANI, G. Multitargeted treatment of cancer cachexia. **Crit Rev Oncog**, v. 17, n. 3, p. 305-14, 2012. ISSN 0893-9675. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22831161> >.

MANTON, K.; AKUSHEVICH, I.; KRAVCHIENCO, J. **Cancer mortality and morbidity patterns in U.S. population: An interdisciplinary approach**. 2009.

MASCHER, H. et al. Repeated resistance exercise training induces different changes in mRNA expression of MAFbx and MuRF-1 in human skeletal muscle. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 294, n. 1, p. E43-51, Jan 2008. ISSN 0193-1849. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17971512> >.

MATHENY, R. W. et al. Serum IGF-I-deficiency does not prevent compensatory skeletal muscle hypertrophy in resistance exercise. **Exp Biol Med (Maywood)**, v. 234, n. 2, p. 164-70, Feb 2009. ISSN 1535-3702. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19064939> >.

MAYER, C.; GRUMMT, I. Ribosome biogenesis and cell growth: mTOR coordinates transcription by all three classes of nuclear RNA polymerases. **Oncogene**, v. 25, n. 48, p. 6384-91, Oct 2006. ISSN 0950-9232. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17041624> >.

MAYER, F. et al. The intensity and effects of strength training in the elderly. **Dtsch Arztebl Int**, v. 108, n. 21, p. 359-64, May 2011. ISSN 1866-0452. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21691559> >.

MOCK, V. et al. A nursing rehabilitation program for women with breast cancer receiving adjuvant chemotherapy. **Oncol Nurs Forum**, v. 21, n. 5, p. 899-907; discussion 908, Jun 1994. ISSN 0190-535X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7937251> >.

MORAES, M. R. et al. Chronic conventional resistance exercise reduces blood pressure in stage 1 hypertensive men. **J Strength Cond Res**, v. 26, n. 4, p. 1122-9, Apr 2012. ISSN 1533-4287. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22126975> >.

MOSTI, M. P. et al. Maximal strength training in postmenopausal women with osteoporosis or osteopenia. **J Strength Cond Res**, v. 27, n. 10, p. 2879-86, Oct 2013. ISSN 1533-4287. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23287836> >.

MURTON, A. J.; GREENHAFF, P. L. Resistance exercise and the mechanisms of muscle mass regulation in humans: acute effects on muscle protein turnover and the gaps in our understanding of chronic resistance exercise training adaptation. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 45, n. 10, p. 2209-14, Oct 2013. ISSN 1878-5875. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23872221> >.

NASCIMENTO, D. A. C. et al. Sustained effect of resistance training on blood pressure and hand grip strength following a detraining period in elderly hypertensive women: a pilot study. **Clin Interv Aging**, v. 9, p. 219-25, 2014. ISSN 1178-1998. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24477221> >.

NICASTRO, H. et al. An experimental model for resistance exercise in rodents. **J Biomed Biotechnol**, v. 2012, p. 457065, 2012. ISSN 1110-7251. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22496606> >.

NIEMAN, D. C. et al. Moderate exercise training and natural killer cell cytotoxic activity in breast cancer patients. **Int J Sports Med**, v. 16, n. 5, p. 334-7, Jul 1995. ISSN 0172-4622. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7558532> >.

OLDERVOLL, L. M. et al. Physical exercise for cancer patients with advanced disease: a randomized controlled trial. **Oncologist**, v. 16, n. 11, p. 1649-57, 2011. ISSN 1549-490X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21948693> >.

ONUCHIC, A. C. et al. Expression of PAFR as part of a prosurvival response to chemotherapy: a novel target for combination therapy in melanoma. **Mediators Inflamm**, v. 2012, p. 175408, 2012. ISSN 1466-1861. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22570511> >.

PEDERSEN, B. K.; SALTIN, B. Evidence for prescribing exercise as therapy in chronic disease. **Scand J Med Sci Sports**, v. 16 Suppl 1, p. 3-63, Feb 2006. ISSN 0905-7188. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16451303> >.

PEIXINHO-PENA, L. F. et al. A strength exercise program in rats with epilepsy is protective against seizures. **Epilepsy Behav**, v. 25, n. 3, p. 323-8, Nov 2012. ISSN 1525-5069. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23103304> >.

PENNA, F. et al. Autophagic degradation contributes to muscle wasting in cancer cachexia. **Am J Pathol**, v. 182, n. 4, p. 1367-78, Apr 2013. ISSN 1525-2191. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23395093> >.

PEPPONE, L. J. et al. Effects of a structured weight-bearing exercise program on bone metabolism among breast cancer survivors: a feasibility trial. **Clin Breast Cancer**, v. 10, n. 3, p. 224-9, Jun 2010. ISSN 1938-0666. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20497921> >.

PETRUZZELLI, M. et al. A switch from white to brown fat increases energy expenditure in cancer-associated cachexia. **Cell Metab**, v. 20, n. 3, p. 433-47, Sep 2014. ISSN 1932-7420. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25043816> >.

PETTAN-BREWER, C.; GOH, J.; LADIGES, W. C. An immunohistochemical approach for monitoring effects of exercise on tumor stromal cells in old mice. **Pathobiol Aging Age Relat Dis**, v. 4, 2014. ISSN 2001-0001. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25147645> >.

SAN JUAN, A. F. et al. Early-phase adaptations to intrahospital training in strength and functional mobility of children with leukemia. **J Strength Cond Res**, v. 21, n. 1, p. 173-7, Feb 2007. ISSN 1064-8011. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17313277> >.

_____. Effects of an intrahospital exercise program intervention for children with leukemia. **Med Sci Sports Exerc**, v. 39, n. 1, p. 13-21, Jan 2007. ISSN 0195-9131. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17218878> >.

SCHMITZ, K. H. et al. Controlled physical activity trials in cancer survivors: a systematic review and meta-analysis. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 14, n. 7, p. 1588-95, Jul 2005. ISSN 1055-9965. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16030088> >.

SCHNEIDER, C.; DENNEHY, C.; CARTER, S. **Exercise and cancer recovery**. 2003.

SEGAL, R. J. et al. Resistance exercise in men receiving androgen deprivation therapy for prostate cancer. **J Clin Oncol**, v. 21, n. 9, p. 1653-9, May 2003. ISSN 0732-183X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12721238> >.

SIEGEL, R. et al. Cancer statistics, 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths. **CA Cancer J Clin**, v. 61, n. 4, p. 212-36, 2011 Jul-Aug 2011. ISSN 1542-4863. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21685461> >.

STEFANETTI, R. J. et al. Regulation of ubiquitin proteasome pathway molecular markers in response to endurance and resistance exercise and training. **Pflugers Arch**, v. 467, n. 7, p. 1523-37, Jul 2015. ISSN 1432-2013. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25104573> >.

STRASSER, B.; PESTA, D. Resistance training for diabetes prevention and therapy: experimental findings and molecular mechanisms. **Biomed Res Int**, v. 2013, p. 805217, 2013. ISSN 2314-6141. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24455726> >.

SUZUKI, H. et al. Cancer cachexia--pathophysiology and management. **J Gastroenterol**, v. 48, n. 5, p. 574-94, May 2013. ISSN 1435-5922. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23512346> >.

TAMAKI, T.; UCHIYAMA, S.; NAKANO, S. A weight-lifting exercise model for inducing hypertrophy in the hindlimb muscles of rats. **Med Sci Sports Exerc**, v. 24, n. 8, p. 881-6, Aug 1992. ISSN 0195-9131. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1406173> >.

TAYEK, J. A. A review of cancer cachexia and abnormal glucose metabolism in humans with cancer. **J Am Coll Nutr**, v. 11, n. 4, p. 445-56, Aug 1992. ISSN 0731-5724. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1506607> >.

TISDALE, M. J. Molecular pathways leading to cancer cachexia. **Physiology (Bethesda)**, v. 20, p. 340-8, Oct 2005. ISSN 1548-9213. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16174873> >.

_____. Mechanisms of cancer cachexia. **Physiol Rev**, v. 89, n. 2, p. 381-410, Apr 2009. ISSN 0031-9333. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19342610> >.

UMPIERRE, D.; STEIN, R. Hemodynamic and vascular effects of resistance training: implications for cardiovascular disease. **Arq Bras Cardiol**, v. 89, n. 4, p. 256-62, Oct 2007. ISSN 1678-4170. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17992383> >.

WESTCOTT, W. L. Resistance training is medicine: effects of strength training on health. **Curr Sports Med Rep**, v. 11, n. 4, p. 209-16, 2012 Jul-Aug 2012. ISSN 1537-8918. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22777332> >.

WHO. **World Cancer Report** 2014.

ZANCHI, N. E.; LANCHI, A. H. Mechanical stimuli of skeletal muscle: implications on mTOR/p70s6k and protein synthesis. **Eur J Appl Physiol**, v. 102, n. 3, p. 253-63, Feb 2008. ISSN 1439-6319. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17940791> >.