TÁSSIA SANTOS RODRIGUES DA COSTA

**Efeito do treinamento físico na função cardíaca e no fenótipo
muscular estriado em câncer de mama**

São Paulo
2019

TÁSSIA SANTOS RODRIGUES DA COSTA

**Efeito do treinamento físico na função cardíaca e no fenótipo
muscular estriado em câncer de mama**

Versão Corrigida

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em
Ciências

Programa de Oncologia

Orientador:
Prof. Dr. Carlos Eduardo Negrão

São Paulo
2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Costa, Tássia Santos Rodrigues da
Efeito do treinamento físico na função cardíaca e
no fenótipo muscular estriado em câncer de mama /
Tássia Santos Rodrigues da Costa. -- São Paulo,
2019.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Oncologia.
Orientador: Carlos Eduardo Negrão.

Descritores: 1.Exercício 2.Neoplasias da mama
3.Metástase neoplásica 4.Disfunção ventricular
esquerda 5.Camundongos

USP/FM/DBD-415/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

“A persistência é o caminho para o êxito!” (Charles Chaplin)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por cada dia nesta luta. Pela força que obtive para assim me manter longe dos meus pais e amigos, e assim continuar.

Ao meu orientador, Professor Negrão pela oportunidade de ingressar em grupo tão prestigioso, por acreditar na minha contribuição e compartilhar seu conhecimento.

À companheira de trabalho e amiga Clévia por compartilhar suas experiências e colaborar para a minha formação acadêmica e pessoal.

À colega de trabalho e técnica do nosso laboratório, Úrsula Urias, que quando chegou em nosso grupo pôde contribuir com sua experiência.

Às Professoras Patrícia Brum e Edilamar Menezes, além da contribuição como parte da Banca Examinadora do Exame Qualificação, colaboraram com um ambiente de trabalho e equipe, também sempre aptos a me auxiliar com carinho. Obrigada pela ótima convivência.

Aos colaboradores do meu trabalho por grandes contribuições, uns mais, outros menos. Obrigada Dr. Marcelo, Dra. Vera, Camila, Prof^a Anamaria, Prof^o Roger, Dra Ludhmila e novavente Clévia, Úsula, Prof^a Patrícia e Prof^a Edilamar.

Agradeço à toda equipe do InCor e do ICESP, por serem disponíveis a me auxiliar. Obrigada às meninas: Mônica, Sandrinha, Ro, Fabi e Elaine. Muito prestativas profissionalmente, além de trabalharem com alegria e compartilharem sempre de momentos mais leves, felizes. Agradeço também ao Patrique!

Aos amigos que conquistei no biotério central, onde passei boa parte da pesquisa. Além de estarem sempre prontos a ajudar, fizeram dos meus dias muito melhores. Obrigada também à Luiza, pronta a resolver o que fosse necessário.

Agradeço ao Comitê de Ética, Professor Eduardo Pompeu e à Vânia. Equipe eficiente, sempre disponível a nos auxiliar.

Aos meus pais que por longo tempo não pude conviver. Por aceitarem e me incentivarem mesmo privando-os da minha presença em tantos momentos importantes em que não estive por perto.

Agradeço grandemente ao meu namorado e grande amigo. Que na falta da minha família, se colocou sempre em função de me apoiar, me incentivar e, principalmente, me compreender em momentos nem sempre tão fáceis.

Agradeço a todos que contribuíram direta ou indiretamente para este trabalho.

RESUMO

Costa TSR. *Efeito do treinamento físico na função cardíaca e no fenótipo muscular estriado em câncer de mama* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

Introdução: Pacientes tratados do câncer de mama apresentam alta incidência de complicações cardiovasculares. As alterações ocorrem em componentes do transporte de oxigênio, tais como, os sistemas pulmonar, cardiovascular, hematológico e músculo-esquelético, afetando a capacidade física. Entretanto, pouco se conhece sobre o impacto da progressão do próprio câncer de mama na função cardíaca e nos fenótipos do músculo esquelético. **Objetivos:** Investigamos: 1) o impacto do câncer de mama na função cardíaca e na musculatura esquelética e 2) se o treinamento físico (TF) previne possíveis alterações na morfologia e função cardíaca, nos fenótipos do músculo esquelético e na capacidade física provocadas pelo câncer de mama. **Métodos:** Foram estudados camundongos transgênicos fêmeas de câncer de mama espontâneo (MMTV-PyMT) de mesma ninhada, divididos em com (+) e sem (-) o oncogene PyMT. No estudo sobre os efeitos do TF foram utilizadas MMTV-PyMT+, divididas em grupo treinado e grupo controle não treinado. A função cardíaca, avaliada por ecocardiografia de alta resolução com imagens do *speckle tracking* dos eixos longitudinal, radial e circunferencial, e a capacidade física pelo teste de esforço máximo (TEMáx), foram aferidas em dois momentos: A) pré-intervenção, quando o tumor se tornou palpável e B) pós-intervenção, quando o tumor atingiu 1 cm³ de volume. O peso corporal foi avaliado a cada semana e o crescimento do tumor a cada 2-3 dias. O peso dos órgãos, músculo esquelético e tumores, as medidas histológicas do cardiomiócito e análises moleculares da via de cálcio (Western blot) e a medida da enzima citrato sintase do músculo esquelético (kit comercial), foram avaliadas após eutanásia. O TF foi realizado durante o crescimento do tumor (13 semanas), 5 dias/s, com intensidade de 50-60% do TEMáx, por 60 minutos. **Resultados:** A capacidade física foi reduzida em camundongos MMTV-PyMT+. O *strain* longitudinal (p-grupo=0,002) e o *strain rate* longitudinal (p-grupo=0,041) do ventrículo esquerdo estavam prejudicados em MMTV-PyMT+ quando comparadas às MMTV-PyMT-. A expressão de fosfolambam (PLB) no cardiomiócito aumentou (p<0,0001) e a razão SERCA2a/PLB reduziu em MMTV-PyMT+ (p=0,009). Houve correlação inversa entre o *strain* longitudinal e a proteína em MMTV-PyMT+ (r=-0,660; p=0,014). O peso do baço e fígado foram maiores, enquanto o peso dos rins e músculos sóleo (oxidativo) e tibial anterior (glicolítico) foram menores no grupo MMTV-PyMT+ do que no grupo MMTV-PyMT-. A capacidade física foi reduzida com o desenvolvimento do câncer. O TF melhorou significativamente o *strain rate* longitudinal (p=0,047) e tendeu a melhorar o *strain* longitudinal (p=0,068). O TF reduziu a expressão da proteína PLB (p<0,0001) e aumentou a expressão da SERCA2a (p<0,0001), trocador cálcio/sódio (NCX) (p=0,044) e da proteína PLB fosforilada (p-PLB) (p=0,0001). O TF não alterou o peso dos órgãos e do músculo sóleo. O TF preservou a capacidade física no primeiro mês de estudo e aumentou a atividade da enzima citrato sintase nos músculos sóleo (p<0,0001) e tibial anterior (p<0,0001). **Conclusão:** O câncer de mama causa alteração subclínica na função do ventrículo esquerdo em camundongos MMTV-PyMT+, o que está associado à desregulação na via de cálcio do cardiomiócito. O TF previne as alterações na função cardíaca, o que são, pelo menos em parte, devido a uma melhora na via intracelular de Ca²⁺. O TF não previne a queda na capacidade física na fase crônica do câncer de mama em camundongos MMTV-PyMT+.

Descritores: Exercício; Neoplasias da mama; Metástase neoplásica; Disfunção ventricular esquerda; Camundongos.

ABSTRACT

Costa TSR. *Effect of exercise training on cardiac function and striated muscle phenotype in breast cancer* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2019.

Introduction: Breast cancer patients have a high incidence of cardiovascular complications. These changes occur in oxygen transport components, such as the pulmonary, cardiovascular, hematological, and skeletal muscle systems, affecting physical capacity. However, little is known about the impact of breast cancer itself in the cardiac function and skeletal muscle phenotypes. **Objectives:** We investigated: 1) The impact of breast cancer on cardiac function and skeletal muscle and 2) Whether exercise training (ET) prevents possible changes in the cardiac morphology and function, skeletal muscle phenotypes, and physical capacity caused by breast cancer. **Methods:** Littermate female transgenic mouse with spontaneous breast cancer (MMTV-PyMT) with (+) and without (-) PyMT oncogene were involved in the study. In the study on the effects of ET, MMTV PyMT+ mice were divided into trained and untrained control groups. Cardiac function was assessed by high-resolution echocardiography with speckle tracking images of the longitudinal, radial and circumferential axes, and physical capacity by exercise tolerance test (ETT) were measured at two moments: A) pre intervention, when the tumor became palpable and B) in the post intervention, when the tumor reached 1cm³ in volume. Body weight was assessed every week and tumor growth every 2-3 days. The weight of organs, skeletal muscle and tumors, the histological analyzes in the cardiac myocyte and the molecular analyzes of the calcium handling protein expression (Western blot), and measure of citrate synthase enzyme (commercial kit) in the skeletal muscle were evaluated after euthanasia. ET was performed during tumor growth (13 weeks), 5 days/w, intensity of 50-60% for 60 minutes. **Results:** Physical capacity was reduced in MMTV-PyMT+ mice. Longitudinal left ventricular strain (p-group=0.002) and strain rate (p-group=0.041) were impaired in MMTV-PyMT+ when compared to MMTV-PyMT-. Phospholamban (PLB) protein expression in the cardiomyocyte increased (p<0.0001) and SERCA2a/PLB ratio decreased in MMTV-PyMT+ (p=0.009). There was an inverse correlation between longitudinal strain and PLB protein in MMTV-PyMT+ (r=-0.660; p=0.014). Spleen and liver weight were higher, whereas kidneys, soleus (oxidative) and anterior tibial (glycolytic) muscles weight were lower in MMTV-PyMT+ than in MMTV-PyMT-. ET significantly improved longitudinal strain rate (p=0.047) the tended to improve the longitudinal strain (p=0.068). ET reduced the expression of PLB protein (p<0.0001) and increased the expression of SERCA2a (p<0.0001), NCX (p=0.044) and phosphorylated-PLB (p-PLB) protein (p=0.0001). ET did not change the weight of the organs and soleus muscle. ET preserved physical capacity in the first month of the study, but not in the remaining period of the study. ET increased citrate synthase activity in soleus (p<0.0001) and anterior tibial (p<0.0001) muscle. **Conclusion:** Breast cancer causes subclinical change in left ventricular function in MMTV-PyMT+ mice, which is associated with deregulation in the cardiomyocyte calcium pathway. ET prevents changes in cardiac function, which are at least in part due to an improvement in the intracellular Ca²⁺ pathway. ET does not prevent the reduction in physical capacity in the chronic phase of breast cancer in MMTV-PyMT + mice.

Descriptors: Breast neoplasms; Neoplasm metastasis; Ventricular dysfunction left; Mice.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Desenho experimental do estudo. Fases pré e pós crescimento do tumor. Grupos MMTV-PyMT+ e MMTV-PyMT- no Subestudo 1 e grupos MMTV-PyMT+ treinados e controles sedentários no Subestudo 2. PNM = tumor palpável e não mensurável; TEmax = teste de esforço máximo e; ECO = e 31
- Figura 2: Peso corporal durante o protocolo experimental em camundongos MMTV-PyMT- e MMTV-PyMT+. Observe que a partir da décima segunda semana o peso corporal tornou-se maior no grupo MMTV-PyMT+ (A) e que essa diferença desaparece quando é excluído o peso do tumor (B). Peso normalizado pelo comprimento da tíbia. Os números na tabela significam o número de camundongos ao longo das semanas (A). * Diferença significativa entre os grupos, $p \leq 0,05$. Teste *t* de Student não pareado. 38
- Figura 3: Peso de fígado (A), baço (B), rins (C), gorduras marrom e branca (D) e pulmões (E) em camundongos MMTV-PyMT- e MMTV-PyMT+. Pesos normalizados pelo comprimento da tíbia. * Diferença entre grupos, $p < 0,05$. Teste *t* de Student não pareado. 39
- Figura 4: Parâmetros morfológicos do coração em MMTV-PyMT- e MMTV-PyMT+ no início e final do protocolo experimental. Diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo (DDFVE) (A), volume diastólico final (VDF) (B), diâmetro sistólico final do ventrículo esquerdo (DSFVE) (C), volume sistólico final (VSF) do ventrículo esquerdo (D), átrio esquerdo (AE) (E) e massa do ventrículo esquerdo (MassaVE) (F). DDFVE, p -grupo=0,003; VDF, p -grupo=0,008; AE, p -interação=0,010, massa do VE, p -grupo=0,0003. Os parâmetros foram corrigidos pelo peso. * Diferença entre grupos, $p=0,008$; † Diferença dentro do grupo, $p < 0,0001$. Animais/grupo: 10-11 MMTV-PyMT- e 12-13 MMTV-PyMT+. ANOVA de medidas repetidas, teste post hoc de Fisher. 42
- Figura 5: Parâmetros funcionais cardíacos em camundongos MMTV-PyMT- e MMTV-PyMT+, obtidos nas fases pré e pós protocolo experimental. *Strain* longitudinal (A); *Strain rate* longitudinal (B). *Strain*, p -grupo=0,002; *Strain Rate*, p -grupo=0,041. Animais/grupo: 11 MMTV-PyMT- and 12 MMTV-PyMT+ mice. ANOVA medidas repetidas. 43

Figura 6: Quantificação de proteínas reguladoras do cálcio intracelular no miócito cardíaco em MMTV- PyMT- e MMTV-PyMT+. Bandas do Western Blot (A); Fosfolambam (PLB) total (B); SERCA2a (C); fosfolambam fosforilada-PLB (D); trocador cálcio/sódio NCX (E) e razão SERCA2a/fosfolambam (SERCA2a/PLB) (F). O PLB foi maior ($p < 0,0001$) e a razão SERCA2a/PLB foi menor nos MMTV-PyMT+ em comparação com os MMTV-PyMT- ($p = 0,009$). Animais/grupo: 7 MMTV-PyMT- e 7 MMTV-PyMT+. * Diferença entre grupos, $p < 0,05$. Teste t de Student não pareado.

..... 44

Figura 7: Correlação inversa entre a expressão de fosfolambam total (PLB) e o *strain* longitudinal ($r = -0,660$; $p = 0,014$). Número de animais: 13 MMTV-PyMT- e MMTV-PyMT+. Correlação de Pearson. 45

Figura 8: Peso dos músculos esqueléticos tibial anterior (TA) e sóleo em camundongos MMTV-PyMT- e MMTV-PyMT+. Pesos normalizados pelo comprimento da tíbia. * Diferença entre grupos, tibial anterior, $p = 0,052$ e sóleo, $p = 0,050$. Animais/grupo: 12-13 MMTV-PyMT- e 14 MMTV-PyMT+. Teste t de Student não pareado. 45

Figura 9: Medida da atividade da enzima citrato sintase no músculo tibial anterior (A) e músculo sóleo (B) em MMTV-PyMT- e MMTV-PyMT+. Animais/grupo: 7 MMTV-PyMT- e 7 MMTV-PyMT+. Teste Mann Whitney (A) e teste t de Student não pareado (B)..... 46

Figura 10: Capacidade física avaliada através de teste de esforço máximo (TEMax) em camundongos MMTV-PyMT- e MMTV-PyMT+, no início e final do protocolo experimental. Distância máxima percorrida (A), p -grupo= $0,006$; tempo, p -interação= $0,041$ (B) e velocidade, p -interação= $0,048$ (C). * Diferença entre grupos, tempo $p = 0,0004$ e velocidade $p = 0,0006$; † Diferença dentro do grupo, tempo $p < 0,0001$ e velocidade, $p = 0,0002$. Animais/grupo: 13 MMTV-PyMT- e 14 MMTV-PyMT+. ANOVA medidas repetidas. Teste post hoc de Fisher. 47

Figura 11: Peso corporal em camundongos MMTV-PyMT+ treinados e sedentários - Números na tabela significam o número de camundongos ao longo das semanas. Animais/grupo: 13 MMTV-PyMT- e 14 MMTV-PyMT+ Teste t de Student não pareado. 48

Figura 12: Tempo de desenvolvimento do tumor (A) e idade de desenvolvimento do tumor (B) em camundongos MMTV-PyMT+ treinados e sedentários. Animais/grupo: 9 MMTV-PyMT- e 12 MMTV-PyMT+. Teste t de Student não pareado 49

Figura 13: Parâmetros morfológicos do coração em MMTV-PyMT+ treinados e sedentários na fase pré e pós protocolo experimental. Diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo (DDFVE) (A); volume diastólico final (VDF) (B); diâmetro sistólico final do ventrículo esquerdo (DSFVE) (C); volume sistólico final (VSF) (D); átrio esquerdo (AE) (E) e; massa do ventrículo esquerdo (MassaVE) (F). Os parâmetros foram corrigidos pelo peso. VDF, p -grupo=0,03. Animais/grupo: 8 MMTV-PyMT- e 11 MMTV-PyMT+. ANOVA medidas repetidas..... 51

Figura 14: Eixo longo longitudinal sistólico *strain* (A) e eixo longo longitudinal sistólico *strain rate* (B), em camundongos MMTV-PyMT+ treinados e sedentários, obtidos nas fases pré e pós do protocolo experimental. O TF aumenta o *strain rate* longitudinal (interação $p=0,046$) e tende a aumentar o *strain* longitudinal (interação $p=0,068$). Animais/grupo: 8 sedentários (SED) e 11 treinados com exercícios (TRE). * Diferença entre grupos, $p=0,028$. ANOVA medidas repetidas, teste post hoc de Fisher..... 52

Figura 15: Quantificação de proteínas reguladoras da via de cálcio no miócito cardíaco em MMTV-PyMT+ treinados e sedentários. Bandas do Western Blot (A); Fosfolambam (PLB)(B); SERCA2a (C); fosfolambam fosforilada (p-PLB) (D); trocador cálcio/sódio (NCX) (E); razão SERCA2a/fosfolambam (SERCA2a/PLB) (F) e razão SERCA2a/NCX (G). PLB ($p<0,0001$), SERCA2a ($p<0,0001$), NCX ($p=0,044$), p-PLB ($p=0,0001$), SERCA2a/PLB ($p<0,0001$) e SERCA2a/NCX ($p<0,0001$). * Diferença entre grupos, $p<0,05$. Animais/grupo: 9 sedentários (SED) e 12 treinados (TRE). Teste t de Student não pareado. 53

Figura 16: Correlação inversa entre o fosfolambam total (PLB) e o *strain* longitudinal sistólico ($r=-0,486$, $p=0,035$, A), e o PLB total e o *strain rate* longitudinal sistólico ($r=-0,486$, $p=0,035$, B). Correlação direta entre a SERCA2a e o *strain* longitudinal sistólico ($r=0,536$, $p=0,018$, C), a SERCA2 e o *strain rate* longitudinal sistólico ($r=0,478$, $p=0,044$, D) e o NCX e o *strain rate* longitudinal sistólico ($r=0,468$, $p=0,043$, E). Número de animais: 19 sedentários (SED) e treinados (TRE). Correlação de Pearson..... 54

Figura 17: Pesos dos músculos tibial anterior (TA) e sóleo em MMTV-PyMT+ sedentários e treinados. Pesos normalizados pelo comprimento da tíbia. Animais/grupo: 6 sedentários (SED) e 6 treinados com exercícios (TRE)* Diferença entre grupos, $p=0,033$. Teste t de Student não pareado. 55

Figura 18: Medida da atividade da enzima citrato sintase nos músculos tibial anterior (A) e sóleo (B) em MMTV-PyMT+ sedentários e treinados. Teste Mann Whitney (A) e teste *t* de Student não pareado (B). Animais/grupo: 9 sedentários (SED) e 11 treinados com exercícios (TRE)* Diferença entre grupos, $p < 0,0001$ 55

Figura 19: Capacidade física avaliada através da distância máxima percorrida em TEmax em camundongos MMTV-PyMT+ treinados e sedentários no período de 3 meses do protocolo experimental. Números na tabela significam o número de camundongos ao longo dos meses. Teste *t* de Student não pareado. 56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Peso dos órgãos e tumores em camundongos MMTV-PyMT- e MMTV-PyMT+.	38
Tabela 2: Parâmetros morfológicos cardíacos através da medida dos diâmetros da fibra e quantificação da área de colágeno em MMTV-PyMT- e MMTV-PyMT+.	40
Tabela 3: Parâmetros morfológicos e funcionais cardíacos em camundongos MMTV-PyMT- e MMTV- PyMT+ nas fases pré e pós do protocolo experimental.....	41
Tabela 4: Capacidade física avaliada pelo teste de esforço máximo em camundongos MMTV-PyMT- e MMTV- PyMT+ no início e no final do protocolo experimental.	46
Tabela 5: Peso de órgãos e tumores em camundongos MMTV-PyMT+ sedentários e treinados.	48
Tabela 6: Parâmetros morfológicos e funcionais cardíacos em camundongos MMTV-PyMT+ treinados e sedentários nas fases pré e pós do protocolo experimental.	50

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

AE	Átrio esquerdo
Akt ou PKB	Proteína quinase B
AMP	Adenosina monofosfato
AMPK	Proteína quinase ativada por adenosina monofosfato
ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina trifosfato
Bax e Bak	Da família Bcl2, representam proteínas intracelulares que ajudam a regular ativação das pró-caspases
Bcl-2	Linfoma de células B 2
C57BL/6J	Espécie de camundongo (camundongo selvagem)
Ca ²⁺	Cálcio
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
C-myc	Myc é uma família de genes reguladores e proto-oncogenes que codificam fatores de transcrição. Consiste em três genes humanos: c-myc, l-myc (MYCL) e n-myc (MYCN)
CyclinD1	É uma proteína necessária para a progressão na fase G1 do ciclo celular
DDFVE	Diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo
DSFVE	Diâmetro sistólico final do ventrículo esquerdo
E/A	Relação da onda E/A do ecocardiograma
E/E'	Relação da onda E/E' do ecocardiograma
EC Circ	Eixo curto circunferencial
ECG	Eletrocardiograma
ECO	Exame de ecocardiograma
EL long	Eixo longo longitudinal
EPM	Erro padrão da média
ER	Receptor de estrogênio
ERBB2	Receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano
EROs	Espécies reativas de oxigênio
Fak	Proteína quinase de adesão focal
FE	Fração de ejeção
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
FoxO	Fork head box O
FS	Fração de encurtamento
GAPDH	<i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>
GATA4	Fator de transcrição caracterizado por sua capacidade de se ligar à sequência de DNA "GATA"(4).
HER2 ou HER2/neu	Receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano
HR	Receptor hormonal
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina 1
IGFBP	Proteína de ligação ao fator de crescimento semelhante à insulina
IL	Interleucina
IPM	Índice de performance do miocárdio
JAK	Janus quinase

MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MMTV-PyMT	Vírus de tumor mamário de camundongo- Oncoproteína T do polioma médio
mTOR	Proteína alvo da rapamicina em mamíferos
MV des Ec	Tempo de desaceleração da onda E corrigido
NCX	Trocador cálcio/sódio
NF-kB	Fator nuclear-kb
NK	Célula natural killer
Nrg1	Neuregulina-1b
P21	Gene com função inibidora de quinase dependente de ciclina (CKI)
P53	Gene de supressão tumoral que codifica uma fosfoproteína regulatória de 53 quilodaltons.
PGC-1 α	Molécula co-ativadora alfa
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase
PLB	Fosfolambam
p-PLB	Fosfolambam fosforilada
PNM	Palpável e não mensurável
PPVE	Espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo
PR	Receptor de progesterona
PTEN	Gene de supressão tumoral que codifica uma fosfatase homóloga a tensina e a auxilina (proteínas do citoesqueleto), também conhecido pela sigla MMAC1 – mutado em vários cânceres avançados.
ras	É um oncogene transdutor de sinal extracelular, responsável pela transmissão de informações da membrana
Rb	Retinoblastoma hiperfosforilada
SERCA2a	Reticulo sarcoplasmático de cálcio 2 ATPase
SIRT	Sirtuína
SIV	Septo interventricular
Smad	<i>Decapentaplégico - gic</i>
SPARC	Proteína secretada ácida e rica em cisteína
Src	É uma tirosina quinase não receptora citoplasmática
STAT	Transdutor de sinal e ativador de proteínas de transcrição
TCI	Tempo de contração isovolumétrica
TE	Tempo de ejeção
TEMáx	Teste de esforço máximo
TF	Treinamento físico
TGF-b1	Fator de crescimento de transformação b
TNF	Fator de necrose tumoral
TRIV	Relaxamento isovolumétrico
VDF	Volume diastólico final
VE	Ventrículo esquerdo
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VSF	Volume sistólico final

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1 Epidemiologia do câncer.....	17
1.2 Caracterização do câncer	17
1.3 Câncer de mama	18
1.3.1 Modelo experimental do câncer de mama.....	19
1.3.2 Comorbidades relacionadas ao câncer de mama	21
1.4 Papel do exercício físico no câncer.....	22
1.4.1 Exercício físico e o tumor	23
1.4.2 Exercício físico e comorbidades relacionadas ao câncer	25
1.4.3 Exercício físico e função muscular	26
1.4.4 Exercício físico e função cardíaca	27
2. OBJETIVOS	29
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
3.1 Modelo experimental.....	29
3.2 Protocolo experimental	30
3.2.1 Subestudo 1	30
3.2.2 Subestudo 2	30
3.3 Medidas e Procedimentos.....	31
3.3.1 Avaliação do Crescimento Tumoral.....	31
3.3.2 Tolerância ao Esforço.....	31
3.3.3 Protocolo de Treinamento Físico.....	32
3.3.4 Avaliação da Morfologia e Função Cardíaca por Ecocardiografia de Alta Resolução	32
3.3.5 Avaliação da Morfologia e Função Cardíaca por <i>Speckle-Tracking</i> (Rastreamento de pontos).....	33
3.3.6 Eutanásia e Coleta de Tecidos.....	33
3.4 Análises Histológicas	34

3.4.1 Análise Morfológica da Musculatura Cardíaca por Coloração com Hematoxilina-Eosina e Picrosírius Red	34
3.5 Atividade da Enzima Citrato Sintase no Músculo Esquelético	34
3.6 Análise da Expressão Proteica	35
3.6.1 Extração Proteica	35
3.6.2 Western Blot	36
3.6.3 Densitometria	36
3.7 Análise Estatística	37
4. RESULTADOS	37
4.1 Impacto do Câncer de Mama na Função Cardíaca e Fenótipos Musculares Esqueléticos	37
4.1.1 Características Físicas	37
4.1.2 Morfologia e Função Cardíaca	39
4.1.3 Fenótipos do Músculo Esquelético	45
4.2 Efeito do Treinamento Físico na Função Cardíaca e Fenótipos Musculares Esqueléticos em Câncer de Mama	47
4.2.2 Morfologia e Função Cardíaca	49
4.2.4 Fenótipos Musculares Esqueléticos	54
4.3 Resumo dos resultados	57
5. DISCUSSÃO	58
5.1 Impacto do Câncer de Mama	58
5.2 Efeitos do Treinamento Físico	61
5.3 Limitações do estudo	63
6. CONCLUSÃO	64
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
APÊNDICE A – Súmula Curricular	74
APÊNDICE B – Manuscrito	75

1. INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia do câncer

A evolução comunicacional e o acesso à informação têm contribuído para melhorar a consciência e os cuidados com a saúde. Essa transformação resultou em redução na incidência e morte por doenças que antigamente eram letais. Esse novo cenário fez com que as chamadas doenças crônico degenerativas assumissem o protagonismo de causa de morte no mundo (MALTA et al., 2019).

O câncer, a segunda maior causa de morte, leva a óbito 9,6 milhões de pacientes por ano, representando um dos principais problemas de saúde pública em todo o mundo (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2018). Aproximadamente 18,1 milhões de novos casos de câncer foram estimados para 2018 e calcula-se uma progressão de 63% desses casos nas próximas duas décadas (2040) (GLOBOCAN, 2018). No Brasil, estima-se para o triênio 2020-2022 uma incidência de 450 mil novos casos de câncer/ano, sendo o câncer de mama o tipo mais comum entre as mulheres, correspondendo a cerca de 29% dos casos novos a cada ano (INCA, 2019).

A crescente incidência do câncer no mundo está associada à “transformação demográfica”, advinda da queda de natalidade, do aumento da urbanização e do envelhecimento populacional. Por outro lado, a transformação sócio-demográfica-epidemiológica, a evolução na área da saúde e a maior informação da população, têm contribuído para o diagnóstico mais precoce da doença, aumentando a chance de sobrevivência em pacientes com câncer. Certamente, não se pode deixar de destacar os avanços no tratamento que têm sido decisivos no aumento do número de sobreviventes com câncer.

No âmbito da prevenção, calcula-se que 50% dos casos de câncer poderiam ser evitados com a implementação de estratégias de prevenção (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2018). Mudanças no estilo de vida, tais como, a prática regular de exercício físico e um hábito alimentar mais saudável encabeçam a lista de condutas na prevenção do câncer.

1.2 Caracterização do câncer

Câncer é um termo que se refere a um conjunto de mais de 200 doenças, com origem genética (INCA, 2017). Apesar da associação do câncer ao estilo de vida moderno, essa doença foi identificada há mais de 2.500 anos e descrita pelo egiptologista americano Edwin Smith (SAITO et al., 2015). Após esse longo período, o câncer continua

sendo um dos maiores desafios de saúde pública no mundo.

O câncer é resultado de alterações estruturais e funcionais de alguns genes com função de controlar o crescimento e a diferenciação normais das células que compõem o organismo. A instabilidade genômica, traduzida em aumento na expressão de oncogenes, e o silenciamento de genes supressores de tumor favorecem o crescimento tumoral (SAITO et al., 2015). Essas alterações podem ser herdadas, devido a mutações em células germinativas, ou adquiridas em consequência da exposição a agentes carcinogênicos ou oncoaceleradores ambientais (físico e/ou químico) ou agentes infecciosos (biológico), por mutações em células somáticas. Dentre alguns exemplos de carcinógenos estão o hábito alimentar, a poluição, a radiação, os vírus e bactérias, a exposição excessiva e prolongada a hormônios, a exposição ao fumo, entre outros (INCA, 2017).

O processo de carcinogênese constitui-se em três fases. O acúmulo de mutações genéticas de forma lenta e gradual que caracteriza o primeiro estágio da carcinogênese, conhecido por “iniciação”. Nesta fase, ainda não é possível detectar um tumor (INCA, 2017). No segundo estágio de carcinogênese, conhecido por “promoção”, as células já alteradas geneticamente na “iniciação”, sofrem os efeitos das oncopromotores que transformam as células iniciadas em células malignas. Para que ocorra essa transformação, o contato continuado com o agente cancerígeno promotor é necessário, o que ocorre de maneira lenta e gradual. A descontinuação da ação dos oncopromotores muitas vezes cessam o processo nesse estágio (INCA, 2017). O terceiro estágio da carcinogênese, conhecido por “progressão”, se caracteriza pela multiplicação descontrolada e irreversível das células alteradas (INCA, 2017). Nessa fase a neoplasia já está instalada, evoluindo até que apareçam as primeiras manifestações clínicas da doença (INCA, 2017).

1.3 Câncer de mama

O tumor mamário possui alta heterogeneidade morfológica, histológica e clínica, apresentando assim, uma ampla variedade de prognósticos e respostas terapêuticas (CIRQUEIRA et al., 2011). Por análise histológica, ele pode ser caracterizado pela sua origem e ainda, em *in situ* ou invasivo (AKRAM et al., 2017). No entanto, a classificação histopatológica é insuficiente para caracterizar os carcinomas de mama, uma vez que os tumores com o mesmo grau, estágio e tipo histológico podem apresentar diferentes prognósticos e respostas à terapia. Por imuno-histoquímica ou expressão gênica é possível caracterizar biomarcadores preditivos no câncer de mama, tais como, os

receptores hormonais (HR) e o receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano (ERBB2+; anteriormente HER2 ou HER2/neu) (CIRQUEIRA et al., 2011). A partir desses receptores, são identificados 3 principais subtipos de câncer de mama, com base na presença ou ausência dos marcadores moleculares para os receptores de estrogênio ou progesterona (receptor hormonal: HR+) e receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano (ERBB2+) (PARK; LEE; LEE, 2018).

O HR+/ERBB2- é um receptor de hormônio e um fator de transcrição que, quando ativado pelo estrogênio (ER) e/ou pela progesterona (PR), ativa as vias de crescimento oncogênico nas células cancerosas da mama, identificado em 70% dos pacientes (WAKS; WINER, 2019). Em relação aos demais, apresenta melhor prognóstico e, na sua maioria, são tumores com baixo grau histológico (CIRQUEIRA et al., 2011). O ERBB2+ é amplificado ou superexpresso em aproximadamente 20% dos cânceres de mama (WAKS; WINER, 2019). Esse subtipo está associado ao mau prognóstico. O terceiro subtipo, triplo-negativo, caracterizado pela ausência dos três marcadores moleculares, são encontrados em 15% dos pacientes que desenvolvem o câncer de mama (WAKS; WINER, 2019). Ainda não há uma terapia-alvo para esse subtipo, pois devido à ausência dos receptores, a doença não responde a tratamentos hormonais.

A maioria das complicações associadas ao câncer de mama deve-se à metástase que se desenvolve em gânglios linfáticos regionais e em órgãos distantes, incluindo ossos, pulmões, fígado e cérebro. Alterações moleculares específicas decorrentes das células tumorais e do microambiente tumoral geram a progressão da doença decorrente do descolamento das células tumorais do tumor primário e invasão no estroma tumoral, entrada das células tumorais nos vasos sanguíneos ou linfáticos, processo conhecido como intravasamento, sobrevivência na corrente sanguínea, saída dos vasos sanguíneos ou linfáticos, processo chamado de extravasamento, colonização do órgão alvo e, finalmente, crescimento metastático (FANTOZZI; CHRISTOFORI, 2006).

1.3.1 Modelo experimental do câncer de mama

O crescente desenvolvimento de modelos animais para o estudo do câncer propicia investigar os mecanismos moleculares da carcinogênese, assim como, o desenvolvimento e validação de novas terapias, conduzindo resultantes na oncologia translacional (PARK; LEE; LEE, 2018). O camundongo MMTV-PyMT, com origem na espécie C57BL/6J, representa um modelo transgênico de desenvolvimento espontâneo do câncer de mama. Neste modelo, a indução do câncer de mama é causada pela expressão da oncoproteína T do poliovírus médio (PyMT) no epitélio mamário sob o controle do promotor, vírus de

tumor mamário de camundongo (MMTV), e formação de adenocarcinomas multifocais (LIN et al., 2003). Em camundongos PyMT, quatro estágios distintamente identificáveis da progressão do tumor ocorrem em um único foco tumoral primário e assemelha-se à patologia do câncer de mama humano em relação à hiperplasia, adenoma, carcinoma precoce e tardio (DUIVENVOORDEN et al., 2018; LIN et al., 2003; PARK; LEE; LEE, 2018). Em adição às semelhanças morfológicas, a expressão de biomarcadores nos tumores de MMTV-PyMT também é consistente com aqueles associados ao mau prognóstico em humanos. Esses incluem a perda de receptores de estrogênio e progesterona e a expressão de ErbB2 e cyclinD1 persistente (DUIVENVOORDEN et al., 2018), além de aumento na expressão de ErbB2 quando progridem para o estágio maligno (LIN et al., 2003; PARK; LEE; LEE, 2018), o que caracteriza o câncer de mama do subtipo Luminal B (ARUN et al., 2016; GUY; CARDIFF; MULLER, 1992; HERSCHKOWITZ et al., 2007; LIN et al., 2003; PÉREZ-SALVIA et al., 2017). Segundo alguns autores (Park, Lee C.H. e Lee H., 2018), a expressão ErbB2 na mama humana de pacientes com câncer representa um mau prognóstico. Esse receptor funciona como um marcador prognóstico, especialmente em tumores de pacientes com metástase linfonodal (PARK; LEE; LEE, 2018).

O PyMT não é expresso em células tumorais da mama em humanos. No entanto, ele atua como um oncogene potente porque o seu produto se liga a vias de transdução de sinal, incluindo às da família Src, ras e PI3 quinase, que são alteradas em câncer de mama em humanos. Além disso, nas glândulas mamárias dos camundongos, a expressão do PyMT é encontrada associada a um aumento do nível de c-myc, um gene que está localizado em uma das três regiões cromossômicas amplificadas, encontrado em câncer de mama primário humano. Ademais, um aumento da infiltração leucocitária também está intimamente associado com a malignidade (BALKWILL, 2004; LIN et al., 2003).

Esses conhecimentos indicam que o modelo MMTV-PyMT mimetiza muitos processos encontrados em progressão do câncer de mama humano não só na morfologia, mas, também, no padrão de expressão de biomarcadores associado com mau prognóstico. Portanto, esse modelo de carcinogênese mamária representa um poderoso meio de investigação de eventos causais associados à progressão tumoral para malignidade e metástase (DUIVENVOORDEN et al., 2018; LIN et al., 2003; PARK; LEE; LEE, 2018).

1.3.2 Comorbidades relacionadas ao câncer de mama

Muitos estudos descrevem uma associação significativa entre o índice de massa corporal (IMC) e a incidência de câncer de mama (ALIKHANI; FERGUSON; NOVOSYADLYY, 2014; BENN et al., 2016). Além disso, mulheres obesas correm maior risco de mortalidade por todas as causas e por câncer de mama quando comparadas a mulheres não obesas com câncer de mama (DEMARK-WAHNEFRIED; CAMPBELL; HAYES, 2012). Essa relação pode ser mais clara na síndrome metabólica causada pela obesidade. Nessa condição, níveis aumentados de estrogênios devido à excessiva atividade de aromatização do tecido adiposo, superexpressão de citocinas pró-inflamatórias, resistência à insulina, hiperativação de fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGFs), adipocito-adipocinas, hipercolesterolemia e estresse oxidativo excessivo, contribuem para o desenvolvimento do câncer de mama em mulheres obesas. Além disso, o aumento do colesterol plasmático leva à formação acelerada de tumores e exacerba sua agressividade (ENGIN, 2017). Guinan et al. (2014) relataram que o aumento da massa corporal pode estar presente ou não em pacientes com câncer de mama. No entanto, esses indivíduos são propensos a desenvolver obesidade sarcopênica, em que a massa de gordura é aumentada e a massa corporal magra é diminuída. Além disso, o aumento da massa adiposa é predominantemente visceral, resultando em um aumento do risco de complicações metabólicas (GUINAN et al., 2014).

Estas alterações na saúde funcional em mulheres podem ser decorrentes também do tratamento do câncer de mama. Após o diagnóstico de câncer, dependendo do tratamento selecionado, podem ocorrer alterações num ou mais componentes do transporte de oxigênio, tais como, os sistemas pulmonar, cardiovascular, hematológico e musculoesquelético (KOELWYN et al., 2012; PEEL et al., 2014). Esse comprometimento contribui para o declínio da capacidade física, que pode persistir por até 7 anos após o tratamento (LAKOSKI et al., 2014). Esses achados são muito relevantes, já que a redução da capacidade física está associada à pior qualidade de vida e a um risco significativamente maior de mortalidade cardiovascular (18%) (BARLOW et al., 2012; MYERS, 2003).

O tratamento do câncer de mama, inclui ressecção cirúrgica, radiação e terapia sistêmica (KESSON et al., 2012). Os agentes sistêmicos, particularmente a quimioterapia citotóxica, associada ou não à terapêutica com alvo molecular, tem contribuído para o aumento da sobrevida do paciente com câncer de mama. No entanto, os efeitos citotóxicos da quimioterapia podem se estender aos demais órgãos e sistemas. Pacientes

tratados com essa conduta terapêutica podem apresentar problemas de saúde geral evidenciados pela redução na capacidade física, devida, em parte, aos efeitos colaterais associados a eventos cardiovasculares, um fenômeno conhecido como toxicidade cardiovascular (LAKOSKI et al., 2014; MOSLEHI, 2016). Essa resposta pode ser transitória ou permanente dependendo do agente utilizado no tratamento. Disfunção endotelial (CHOW et al., 2006), síndrome coronariana aguda (HERRMANN et al., 2016), arritmias supraventriculares e ventriculares (BUZA; RAJAGOPALAN; CURTIS, 2017) e disfunção ventricular (BLOOM et al., 2017), levando à insuficiência cardíaca (HERSHMAN et al., 2018), têm sido descritas durante ou após o tratamento quimioterápico.

O que não se conhece é se o câncer, por si só, pode provocar alterações sistêmicas que afetam a fisiologia cardíaca e muscular esquelética. Esta é uma das razões desse estudo. O desafio é investigar se o câncer de mama altera a função cardíaca, fenótipos do músculo esquelético e capacidade funcional.

1.4 Papel do exercício físico no câncer

Evidências acumuladas mostram que o exercício físico contribui para uma melhor qualidade de vida e saúde, além de prevenir doenças crônico-degenerativas (MYERS, 2003). Sabe-se, também, que indivíduos que praticam exercício físico apresentam um melhor prognóstico de vida independentemente da presença de doenças (GABRIEL; ZIERATH, 2017). O exercício físico minimiza os efeitos associados às doenças (PEDERSEN; FEBBRAIO, 2012) e ajuda no manejo dos efeitos colaterais de tratamentos medicamentosos (SCOTT et al., 2016).

O exercício físico está relacionado a um menor risco de câncer, incluindo mama (25%) (LYNCH; NEILSON; FRIEDENREICH, 2011), próstata (10%), (LIU et al., 2011), pulmão (24%) (BRENNER et al., 2016), cólon proximal (24%) e distal (23%) (ROBSAHM et al., 2013), endométrio (17%), ovário (11%) (ZHONG; CHEN; LV, 2014), gastroesofágico (18%) (BEHRENS et al., 2014), renal (12%) (BEHRENS; LEITZMANN, 2013), e pâncreas (11%) (FARRIS et al., 2015). No estudo de Cormie, Zhang e Schmitz (2017), com um total de 100 estudos revisados, ficou evidenciado que o exercício realizado após o diagnóstico de câncer diminui o risco relativo de mortalidade e recorrência, além dos efeitos adversos. Apesar da complexidade existente em relação ao tratamento do câncer, a prática de exercício é segura e bem tolerada (STOUT et al., 2017). O Colégio Americano de Medicina do Esporte ressalta que o exercício físico é seguro durante e após os vários tipos de tratamento de câncer, inclusive aqueles intensivos, como o transplante de medula óssea (SCHMITZ et al., 2010). Essa recomendação tem sido endossada pelas principais

organizações de saúde, tais como, a Organização Mundial da Saúde (OMS), a Sociedade Americana de Câncer e a Sociedade de Oncologia Clínica da Austrália.

Em conjunto, esses estudos dão sustentação para o fato de que o exercício aeróbico em intensidade moderada realizado por 150 minutos por semana ou o exercício vigoroso por 75 minutos por semana (STOUT et al., 2017) é uma conduta preventiva e terapêutica adjuvante no tratamento do câncer.

1.4.1 Exercício físico e o tumor

Apesar de não haver um consenso sobre o impacto positivo do exercício físico no tumor, alguns estudos em animais de experimentação mostram que o exercício pode retardar o desenvolvimento do tumor (HIGGINS et al., 2015; HOJMAN et al., 2018) e a massa tumoral (HOJMAN et al., 2011, 2018), e mesmo, prevenir metástase (WOLFF et al., 2015; ZHANG et al., 2015). Esses efeitos parecem estar diretamente relacionados à alteração na “homeostasia” e, em consequência, no microambiente tumoral. O treinamento físico pode ajudar no tratamento do câncer através do seu efeito nas etapas biológicas de desenvolvimento, manutenção e progressão do tumor (HANAHA; WEINBERG, 2000, 2011). A sinalização proliferativa sustentada através da desregulação da sinalização mitogênica é considerada a principal característica da transformação maligna (RUIZ-CASADO et al., 2017). O exercício pode ajudar induzindo a redução nos níveis circulantes de múltiplos hormônios, em particular o IGF-1 (um mitógeno que desencadeia a proliferação através da ativação da sinalização de Ras-MAPK) e prevenindo a apoptose por ativação das vias PI3K-Akt e JAK/STAT (KALAANY; SABATINI, 2009; STANDARD et al., 2014).

Na fase de inativação dos genes supressores de tumor, o treinamento físico aumenta a ativação do gene p53, que é um dos mais importantes e estudados fatores de supressão de tumor. O exercício físico provoca também aumento na expressão de outros genes supressores de tumor, tais como, o p21, o IGFBP -3, e o PTEN (RUIZ-CASADO et al., 2017). Ademais, o exercício reduz a proliferação de células tumorais, estimulando a fosforilação de AMPK. Essa resposta reduz a atividade de mTOR (PIGUET et al., 2015) e os níveis de proteína de retinoblastoma hiperfosforilada (Rb) (JIANG; ZHU; THOMPSON, 2009; ZHU et al., 2008).

Os defeitos na apoptose são fenômenos comuns na iniciação e progressão do câncer. O exercício físico estimula a apoptose – uma resposta acompanhada de aumento na atividade da caspase-3 (JIANG; ZHU; THOMPSON, 2009) e proteínas pró apoptóticas, tais como, a Bax e Bak, induzidas pela p53 (HIGGINS et al., 2015). Efeitos do exercício

sobre a redução na concentração de proteína antiapoptótica, como a Bcl-2 também foi encontrada (BARNARD et al., 2007).

A indução de angiogênese anormal é um importante passo para a maior agressividade da doença. As alterações provocadas pelo exercício no microambiente tumoral contribuem para uma normalização da circulação. Esse processo ocorre pela melhora da perfusão/vascularização intratumoral (BETOF et al., 2015; JONES et al., 2010), o que contribui para o aumento no suprimento sanguíneo e a redução na hipóxia. Há evidências também de que a melhora na circulação facilita a ação de medicamentos no tumor (SHANNON et al., 2003).

O exercício tem também um papel importante na invasão e na metástase das células tumorais em tecidos adjacentes e/ou distantes. Ele provoca redução no crescimento do tumor e diminuição e aumento, respectivamente, nas proteínas b-catenina nuclear e glicoproteína E caderina, relacionadas ao processo de adesão celular (JU et al., 2008). Além disso, supressão da transição epitélio-mesenquimal induzida por TGF- β 1 foi observada em células transplantadas de câncer de fígado de animais treinados. Os níveis de outras proteínas, tais como, a ocludina e a claudina-5 (JIA et al., 2014; WOLFF et al., 2015), que desempenham um papel crucial na função da barreira hematoencefálica, foram mantidas no grupo camundongos com tumor e exercitados em comparação com seus respectivos controles.

O treinamento aeróbio ainda estende os seus efeitos na inflamação provocada pelo tumor. Esse mecanismo parece ocorrer devido à redução na infiltração de macrófagos e ao acúmulo de neutrófilos nos tecidos tumorais, observados em camundongo com câncer (ALMEIDA et al., 2009; ZIELINSKI et al., 2004). Foi demonstrado também que o tratamento com o betabloqueador (propranolol) diminui a supressão do crescimento tumoral provocada pelo exercício, bem como a mobilização de células natural killer (NK) e infiltração intratumoral de células imunes (PEDERSEN et al., 2016). Esses dados identificam a importância da atividade simpática cardíaca para as ações do treinamento no tumor.

O progresso obtido na última década acrescentou dois conhecimentos sobre o câncer: 1) a reprogramação do metabolismo energético e 2) a evasão da destruição imunológica (HANAHA; WEINBERG, 2011). Hoje, sabemos que o exercício pode atuar em ambas (RUIZ-CASADO et al., 2017). Na reprogramação do metabolismo energético tumoral, o exercício reduz os níveis plasmáticos de insulina e IGF-1 e, conseqüentemente, os níveis de corticosterona, sugerindo que os mecanismos de detecção de nutrientes que regulam a homeostase de glicose são alterados (ZHU et al.,

2008). O exercício de intensidade leve a moderada induz vias relacionadas à imunidade, como a mobilização de NK (PEDERSEN et al., 2016).

Em uma visão mais recente, os benefícios anticâncer do exercício podem ser classificados em agudos e crônicos. Isto é, aqueles relacionados a uma única sessão de exercício e aqueles relacionados aos efeitos de sessões que se repetem ao longo do tempo. Alguns investigadores propõem que o efeito agudo do exercício tem um papel importante no câncer através do aumento das miocinas (HOJMAN et al., 2018; RUIZ-CASADO et al., 2017). Curiosamente, a função anticancerígena não é verificada quando as miocinas como, por exemplo, as SPARC, são liberadas por outros órgãos e não pelo músculo em ação (AOI et al., 2013). Estima-se que existam aproximadamente 600 miocinas, sendo a IL-6 a mais efetiva (HOJMAN et al., 2018). Geralmente, essas miocinas são liberadas pelos músculos durante o exercício para regular a troca de energia e promover adaptações metabólicas nos próprios músculos e outros órgãos (PEDERSEN; FEBBRAIO, 2008).

1.4.2 Exercício físico e comorbidades relacionadas ao câncer

O exercício físico tem um papel importante nas comorbidades relacionadas ao câncer e no tratamento dessa doença. Após avaliação de mais de cem estudos de intervenção com exercícios publicados em pacientes com câncer, ficou evidenciado que o exercício associa-se à melhora na aptidão cardiorrespiratória, capacidade física e composição corporal (BALLARD-BARBASH et al., 2012). É conhecido também que o exercício físico pode influenciar fatores de risco que predispõe a doenças. Um estudo com 1.504 mulheres mostrou redução de 30% no risco de câncer em praticantes de atividade física (MCCULLOUGH et al., 2013), consistente com estudos anteriores em que se observou redução média de 25% no risco de câncer de mama (LYNCH; NEILSON; FRIEDENREICH, 2011).

Embora o exercício físico utilizado como estratégia preventiva contra o câncer de mama seja mais frequentemente associado à redução da obesidade, alguns sugerem que a proteção é mais ampla que a relacionada à perda de peso (ALEGRE et al., 2013; BERNSTEIN, 2009; BERNSTEIN et al., 1994; FRIEDENREICH et al., 2010; LYNCH; NEILSON; FRIEDENREICH, 2011; MORRIS et al., 2010). Estudos recentes indicam que o exercício físico previne o câncer de mama através da redução dos níveis de hormônios sexuais em mulheres, que não são necessariamente produzidos pelo tecido adiposo. Em estudo com mulheres na pré-menopausa com alto risco de câncer de mama, demonstraram que 300 minutos de exercício vigoroso semanais por sete ciclos

menstruais reduziu os níveis de estrogênio em 18,9% e de progesterona em 23,7% (KOSSMAN et al., 2011). Estas repostas são muito importantes, uma vez que os estrogênios estão envolvidos no câncer de mama pela estimulação da mitose e regulação da proliferação celular (ALEGRE et al., 2013).

Os efeitos do exercício parecerem se aplicar a diferentes tipos de câncer de mama. Seguindo as recomendações internacionais de prática de exercício físico, alguns investigadores verificaram uma redução significativa no risco para todos os subtipos de câncer de mama (LOPE et al., 2016). Entretanto, segundo esses autores, as mulheres na pós-menopausa precisam de um volume maior de exercício para obter tais benefícios (LOPE et al., 2016).

Em camundongo *transgenic polyoma middle oncoprotein* (PyMT), HER2+, a corrida voluntária atenuou a progressão do tumor no início do curso do câncer de mama invasivo (GOH et al., 2013). A sinalização de citocinas para células T relacionadas à imunossupressão é regulada negativamente através da atenuação na expressão do gene CCL22, mesmo quando o exercício não influencia mais o crescimento do tumor (GOH et al., 2013).

Os benefícios do exercício em sobreviventes de câncer de mama estão relacionados diretamente à melhora na capacidade funcional e na qualidade de vida. Estudos mostram que a associação do treinamento aeróbico com treinamento resistido em sobreviventes de câncer de mama determinaram melhora significativa da aptidão cardiorrespiratória, força muscular, composição corporal e fadiga (ROGERS et al., 2012). Geralmente, aumentos de 15% - 25% no consumo de oxigênio de pico são observados após o treinamento físico (BOUCHARD et al., 2011). Essa é uma resposta importante porque o consumo de oxigênio de pico se relaciona ao prognóstico em pacientes com câncer de mama (JONES et al., 2012). As recentes evidências indicam também que o treinamento físico aeróbico durante o tratamento do câncer de mama é uma maneira eficaz de manter e/ou melhorar a capacidade física e a qualidade de vida nessas pacientes (SCOTT et al., 2016).

1.4.3 Exercício físico e função muscular

O exercício físico pode provocar adaptações nas vias moleculares relacionadas à proteínas contrateis (WIDRICK et al., 2002), *turnover* de ATP, fluxo de cálcio (KRAMER; GOODYEAR, 2007), função mitocondrial (CARTEE et al., 2017), regulação metabólica (GABRIEL; ZIERATH, 2017), balanço redox e produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (KRAMER; GOODYEAR, 2007), sinalização intracelular (BENZIANE et al., 2008)

e respostas transcricionais (PILEGAARD; SALTIN; NEUFER, 2003) no músculo esquelético. Há consenso de que essas adaptações ao treinamento físico envolvem uma alteração gradual no conteúdo proteico e na atividade enzimática.

Os efeitos do treinamento físico se estendem a mediadores inflamatórios, alterados em alguns tipos de câncer, como aqueles encontrados em camundongos com câncer de mama HER2+, MMTV-PyMT (CHEN et al., 2014; WANG et al., 2017). Durante a contração muscular há aumento na concentração de cálcio sarcoplasmático e alteração na relação AMP/ATP (adenosina monofosfato/adenosina trifosfato), devido à utilização de ATP. Esses processos levam à ativação da proteína quinase ativada por AMP (AMPK) (SALMINEN; HYTTINEN; KAARNIRANTA, 2011; STEINBERG; CARLING, 2019). A sinalização de AMPK, via SIRT1, PGC-1 α , p53 e Fork head box O (FoxO) inibe as respostas inflamatórias induzidas pelo fator nuclear-kB (NF-kB) (SALMINEN; HYTTINEN; KAARNIRANTA, 2011). O exercício pode gerar também um ambiente anti-inflamatório. A IL6 derivada do músculo inibe a produção de TNF e estimula a produção das citocinas anti-inflamatórias IL1ra e IL10 (PEDERSEN, 2017).

Apesar desses avanços, os efeitos do treinamento físico na musculatura esquelética no câncer de mama ainda são pouco conhecidos. Essa é uma das propostas desse estudo. Pretende-se investigar se o treinamento de intensidade moderada provoca alterações em alguns fenótipos do músculo esquelético.

1.4.4 Exercício físico e função cardíaca

Evidências acumuladas ao longo das últimas décadas mostram que o treinamento físico provoca profundas mudanças no coração. O exercício físico dinâmico praticado com frequência aumenta a massa e a cavidade do ventrículo esquerdo (NYSTORIAK; BHATNAGAR, 2018). Essas adaptações se estendem à função cardíaca. O estresse hemodinâmico intermitente de sobrecarga de pressão, volume ou ambos leva ao remodelamento adaptativo do coração, cujo resultado é o aumento no volume sistólico e o débito cardíaco (NYSTORIAK; BHATNAGAR, 2018). Essas respostas ocorrem com preservação ou mesmo aumento da função contrátil (NYSTORIAK; BHATNAGAR, 2018). Estudos clínicos demonstram que o treinamento aeróbio causa melhora da função sistólica e diastólica (ESCH et al., 2006; FERGUSON et al., 2001). E estudos em modelo animal evidenciam velocidades aumentadas de contração e relaxamento de cardiomiócitos (KEMI et al., 2008; MOORE et al., 1993).

Em nível molecular, o treinamento físico pode provocar adaptações em proteína contráteis e no fluxo de cálcio. Ademais, o treinamento físico pode prevenir alterações

provocadas por um ambiente patológico. Estudo experimental em animais mostrou que o treinamento físico previne as alterações na função cardíaca e na modulação de cálcio no miócito cardíaco provocada pela obesidade. A redução na fração de encurtamento do ventrículo esquerdo e a redução no sítio Ser²⁸⁰⁸ do receptor de rianodina e fosforilação no sítio Thr¹⁷ do fosfolambam e o estado redox são prevenidos pelo treinamento físico em animais obesos (PAULINO et al., 2010).

Sabe-se que o bloqueio dos receptores ErbB é uma conduta padrão no tratamento do câncer de mama (MOSLEHI, 2016). Contudo, essa terapia alvo provoca alterações na síntese de proteínas de miofilamentos via fosfatidilinositol-3-quinase/serina-treonina quinase (PI3K/Akt), na hipertrofia celular via proteína-quinases ativadas por mitógenos (MAPK) e na sobrevivência celular via proteína quinase de adesão focal (Fak) (SCOTT et al., 2013). Essas alterações moleculares contribuem para uma condição conhecida por *cardiotoxicidade* (MOSLEHI, 2016). O exercício físico aumenta a síntese e a liberação de neuregulina-1 β (Nrg1), o que resulta em ativação das vias de PI3K/Akt, MAPK e Fak. O exercício age inibindo o fator de crescimento de transformação β (TGF- β 1) que modula o *decapentaplégico* - gic (Smad) e a Fak envolvidos na degradação de proteínas e sobrevivência celular, respectivamente. Ele aumenta também a regulação do fator de transcrição GATA4 (GATA4), envolvido na síntese de proteína e na ativação da proteína quinase ativada por AMP (AMPK) que regula a biogênese mitocondrial. Não menos importante é o papel do exercício aeróbio nos moduladores vasculares. Ele aumenta a expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), as células progenitoras endoteliais dependentes de óxido nítrico e estimula os fatores de transcrição ativados por tirosinas quinases (STAT3) que causa secreção de eritropoietina e combinação com células progenitoras cardíacas. O resultado dessas respostas é a diferenciação em células endoteliais (SCOTT et al., 2013).

Estes conhecimentos colocam o exercício numa posição muito importante na prevenção de alterações na função cardíaca e nas vias moleculares associadas decorrentes de doença e/ou de terapia oncológica. Portanto, aprofundar os conhecimentos sobre o papel do exercício nesse cenário é urgente e de grande interesse. Neste estudo, uma das propostas é verificar se o exercício físico previne alterações na morfologia e na função cardíaca provocadas pelo câncer de mama. Nós levantamos a hipótese de que o câncer de mama provocaria disfunção cardíaca e diminuiria a tolerância ao exercício. O TF atenuaria ou impediria a disfunção cardíaca induzida pelo câncer. Para tanto, nós usamos camundongos transgênicos como modelo de câncer de mama espontâneo.

2. OBJETIVOS

- 1) Estudar o impacto do câncer de mama na morfologia e função cardíaca, assim como em mecanismos moleculares associados;
- 2) Estudar a influência do câncer de mama nos fenótipos do músculo esquelético;
- 3) Investigar se o treinamento físico de intensidade moderada previne alterações morfológicas e funcionais do coração, assim como em mecanismos moleculares associados;
- 4) Investigar se o treinamento físico de intensidade moderada previne alterações nos fenótipos da musculatura esquelética.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Modelo experimental

No presente trabalho foram utilizados camundongos fêmea transgênicos para câncer de mama da linhagem MMTV-PyMT (GUY; CARDIFF; MULLER, 1992) com origem genética em C57Bl6/J. Nesse modelo, são observadas perda de receptores de estrogênio e progesterona (ERs e PRs) e superexpressão de ErbB2 / Neu e ciclina D1, comparável ao que se detecta no câncer de mama humano com mau prognóstico (DUIVENVOORDEN et al., 2018; LIN et al., 2003; PARK; LEE; LEE, 2018). Os camundongos foram provenientes do biotério central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). Os animais foram mantidos nesse mesmo biotério, alocados em caixa de polipropileno padrão para camundongo (30 x 20 x 13 cm) com tampa gradeada forrada com maravalha esterilizada (máximo de 5 animais por gaiola), em ambiente com temperatura controlada de 22°C - 24°C, umidade relativa de 45%–50% e ciclo de luminosidade invertido de 12 horas (06:00–18:00 h), recebendo ração e água *ad libitum*. Os tecidos de interesse foram adequadamente coletados e armazenados conforme as análises a que foram submetidos.

Esse estudo foi submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FMUSP com registro de protocolo número 061/16. O estudo está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal, conforme a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA-MCTIC).

3.2 Protocolo experimental

Foram realizados dois subestudos. Em ambos os animais foram identificados, pesados semanalmente para avaliação da massa corporal e monitorados a cada dois ou três dias para verificação do crescimento tumoral (PARKINS et al., 2018).

3.2.1 Subestudo 1

Neste subestudo foram utilizados 15 camundongos MMTV-PyMT+ (8 para histologia e 7 para análise molecular) e 14 MMTV-PyMT-, como controles, e irmãos de prole (7 para histologia e 7 para análise molecular). Conforme desenho experimental apresentado na Figura 1, o estudo foi iniciado por volta da 12^a semana de vida dos animais, período em que o tumor era palpável e não mensurável (PNM), e finalizado quando o tumor atingiu volume de 1 cm³, quando os camundongos tinham em média de 22 semanas de idade, de acordo com as recomendações éticas do CEUA. Em ambos os momentos, os camundongos foram submetidos à ecocardiografia de alta resolução e teste de esforço máximo em esteira para verificação da morfologia e função cardíaca, e capacidade física, respectivamente. Ao final do estudo, os camundongos foram eutanasiados e os órgãos coletados para as investigações moleculares e morfológicas (Figura 1).

3.2.2 Subestudo 2

Neste subestudo foram estudados apenas camundongos transgênicos para desenvolvimento do câncer de mama MMTV-PYMT+. Os camundongos foram aleatoriamente divididos em 2 grupos: 1) Sedentários (9 camundongos) e 2) Treinados (12 camundongos). O desenho experimental, apresentado na Figura 1 foi realizado em período semelhante ao subestudo 1, respeitando o tempo de surgimento tumoral e crescimento até o tamanho de 1 cm³, quando os camundongos atingiram de 23 (sedentários) e 25 (treinados) semanas de idade.

Figura 1: Desenho experimental do estudo. Fases pré e pós crescimento do tumor. Grupos MMTV-PyMT+ e MMTV-PyMT- no Subestudo 1 e grupos MMTV-PyMT+ treinados e controles sedentários no Subestudo 2. PNM = tumor palpável e não mensurável; TEMax = teste de esforço máximo e; ECO = e

3.3 Medidas e Procedimentos

3.3.1 Avaliação do Crescimento Tumoral

A avaliação do crescimento tumoral foi realizada por palpação e aferição do tamanho tumoral por meio de paquímetro digital (PARKINS et al., 2018). O volume tumoral foi estimado utilizando as medidas transversais e diagonais aplicadas a fórmula:

$$V (cm^3) = \frac{(d^2 \times D \times 0,52)}{1000} \quad (1)$$

Onde:

d^2 (mm): Medida do diâmetro menor do tumor.

D (mm): Medida do diâmetro maior do tumor

V (cm³): Volume estimado do tumor.

Essa avaliação ocorreu a cada 2 ou 3 dias.

3.3.2 Tolerância ao Esforço

A capacidade máxima de exercício foi estimada através da realização de teste incremental de corrida em esteira. Os animais foram posicionados individualmente sobre a esteira rolante com velocidade inicial de 6 m/min e incrementos de 3 m/min a cada 3 minutos até ser atingida a velocidade máxima suportada por cada animal (FERREIRA et al., 2007). O critério para a determinação da exaustão do animal e interrupção do teste foi o momento em que o camundongo não era mais capaz de correr mediante o incremento

de velocidade da esteira. A distância máxima percorrida (metros) e a velocidade máxima alcançada (m/min) foram registradas para avaliação da capacidade física dos animais.

3.3.3 Protocolo de Treinamento Físico

O treinamento físico de corrida em esteira ergométrica (AVS Projetos, São Carlos, SP, Brasil), consistiu em sessões diárias, durante 60 minutos e intensidade correspondente à 50-60% da velocidade máxima obtida no teste de tolerância ao esforço (FERREIRA et al., 2007).

3.3.4 Avaliação da Morfologia e Função Cardíaca por Ecocardiografia de Alta Resolução

Para avaliar a morfologia e função cardíaca, o ecocardiograma transtorácico de alta resolução foi realizado utilizando o sistema Vevo 2100 (VisualSonics, Toronto, ON) com uma sonda MS400 (frequência de linha central de 30 MHz). Os camundongos foram anestesiados com isoflurano (Zoetis IsoFlo, Kalamazoo, MI; indução de 3,0% e manutenção de 1-3%) e posteriormente, apoiados em decúbito dorsal em mesa aquecida, com eletrocardiograma incorporado (ECG) e a temperatura central mantida a 37 ° C. A anestesia foi mantida com 1% a 3% de isoflurano ao longo do estudo. A aquisição da imagem foi realizada no modo bidimensional no corte paraesternal do eixo longo seguido pelos cortes do eixo curto e apical de 4 câmaras. A imagem bidimensional guiada no modo M foi usada para medir o diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo (DDFVE), o diâmetro sistólico final do ventrículo esquerdo (DSFVE), o septo interventricular (SIV) e espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo (PPVE), corrigidos pelo peso corporal. Além disso, volumes e massa do ventrículo esquerdo ($Massa\ VE = 0,8 \times \{1,04 \times [(DDFVE + PPVE + SIV)^3 - (DDFVE)^3]\}$), ambos corrigidos pelo peso corporal, fração de encurtamento ($FS = [(DDFVE - DSFVE)/DDFVE] \times 100$) e a fração de ejeção (FE) pelo método de Teichholz foram calculados a partir da ecocardiografia em modo M (SALEMI et al., 2005). O diâmetro do átrio esquerdo (AE) foi adquirido a partir da visualização do eixo longitudinal paraesternal bi-dimensional. A função diastólica foi avaliada utilizando ecocardiograma convencional com as técnicas de imagem do Doppler tecidual e Doppler por onda pulsada. As velocidades de influxo transmitral foram registradas a partir de uma visão apical de eixo longo, definindo o volume da amostra na ponta dos folhetos mitrais. A partir das formas de onda espectrais do Doppler de ondas pulsadas, medimos o pico das velocidades transmitrais diastólicas precoces e tardias (ondas E e A) para obter a relação E / A. O tempo de desaceleração da onda E (MV des

E) e o tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV), que refletem o enchimento do VE, foram corrigidos pela frequência cardíaca (c) (dividida pela raiz quadrada do intervalo RR). O tempo de contração isovolumétrica (TCI) e tempo de ejeção (TE) foram medidos para obtenção do índice de performance do miocárdio ($IPM = (TCI + TRIV)/TE$). A partir das formas de ondas espectrais do Doppler tecidual, E' (velocidade do pico anular mitral diastólico no septo) foi medida e a relação E / E' foi calculada.

3.3.5 Avaliação da Morfologia e Função Cardíaca por *Speckle-Tracking* (Rastreamento de pontos)

As análises de imagem por *speckle-tracking* foram realizadas no corte paraesternal do eixo longo e eixo curto (nível papilar) usando um sistema Visual Sonics Vevo 2100 (Visual Sonics, Toronto, ON). As configurações de profundidade, largura e ganho da imagem foram otimizadas para melhorar a qualidade da imagem. Eixos bidimensionais com taxa de quadros ≥ 200 quadros/segundo foram utilizados para o *speckle-tracking*. Todas as imagens foram armazenadas digitalmente em circuitos de cinema constituídos por 300 quadros. Todas as imagens foram obtidas e analisadas usando o *software* Vevo Strain (Vevo LAB 1.7.1). O *strain*, que avalia mudanças no comprimento em relação ao comprimento inicial, foi calculado no eixo radial curto e longo (espessamento da parede do VE ao longo do eixo do raio), longitudinal (encurtamento do VE ao longo do eixo longo) e *strain* circunferencial (redução na circunferência da cavidade do VE). Também foi medido o *strain rate*, que é a taxa de alteração dessa deformação ao longo do tempo (DE LUCIA et al., 2019).

3.3.6 Eutanásia e Coleta de Tecidos

Os camundongos em que os tumores atingiram o tamanho de 1 cm³ realizaram o teste de tolerância ao esforço e ecocardiografia em diferentes dias, respectivamente. Então, foram eutanasiados após dose letal por inalação de isoflurano (5%). Após perda de consciência e atividade motora, houve exsanguinação e remoção de tecidos para análise. Os pulmões, fígado, baço, rins, gorduras (marrom e branca), tumor e músculos (sóleo e tibial anterior) foram pesados. Os tecidos de interesse foram adequadamente coletados e armazenados conforme as análises a que foram submetidos.

3.4 Análises Histológicas

3.4.1 Análise Morfológica da Musculatura Cardíaca por Coloração com Hematoxilina-Eosina e Picrosírius Red

As seções do coração foram fixadas em formalina tamponada a 10% por 48 horas. Em seguida os tecidos foram encaminhados ao serviço de confecção de lâminas do Laboratório de Anatomia Patológica do Instituto do Coração – HCFMUSP.

Após o processamento histológico de rotina, seccionou-se tecido embebido em parafina (cortes com 5 micrômetros de espessura) e as lâminas histológicas foram coradas com Hematoxilina-Eosina e Picrosírius Red para análise quantitativa dos diâmetros dos cardiomiócitos e da fração da área de colágeno, respectivamente. A medida do diâmetro transversal dos cardiomiócitos foi realizada em sistema computadorizado (LEICA QUANTIMET 500, Alemanha) acoplado a um microscópio óptico com aumento de 40x. Os diâmetros dos cardiomiócitos foram calculados a partir da média de 10 campos por animal, considerando-se as fibras intactas.

Para a análise do grau de fibrose miocárdica, foi realizada a média de uma varredura completa da parede ventricular em microscópio óptico com luz polarizada (OLYMPUS BX-41). Com a coloração das fibras de colágeno foi possível diferenciar o colágeno tipo I (laranja-amarelado e laranja avermelhado) e tipo III (verde ou verde amarelado) (JUNQUEIRA; BIGNOLAS; BRENTANI, 1979). As imagens de todo o ventrículo esquerdo foram capturadas em objetiva 40x e analisadas com o auxílio do software *Image J*, utilizando o plug-in *threshold colour* para obtenção do percentual de colágeno por meio da análise dos pixels corados de acordo com a medida das áreas. Os valores no *threshold colour* para cada tipo de colágeno foram padronizados: matriz 0-40 para cor vermelha do colágeno tipo I e 45-120 para a cor verde do colágeno tipo III, saturação 0-255 e brilho 5-225 para ambos.

3.5 Atividade da Enzima Citrato Sintase no Músculo Esquelético

Utilizamos como marcador do treinamento físico a atividade da enzima citrato sintase. Esta enzima catalisa a primeira reação do Ciclo de Krebs, quando acetil-coenzima A (acetil-CoA) é condensada com oxaloacetato, formando citrato e coenzima A (CoA). Essa reação é essencial para todo o Ciclo de Krebs e, conseqüentemente, da formação de energia pelo metabolismo aeróbio.

Para avaliar a atividade máxima da enzima citrato sintase, os músculos esqueléticos sóleo e tibial anterior foram homogeneizados a 4°C em tampão de extração

(pH 7,4) contendo Tris-base (50 mM) e EDTA (1 mM). As amostras foram então centrifugadas a 3000g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi utilizado para a realização da cinética enzimática. As proteínas no homogenato foram quantificadas pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

A atividade máxima da enzima foi determinada segundo método de Alp e Newsholme (ALP; NEWSHOLME; ZAMMIT, 1976), a partir de quantificação do complexo formado entre a CoA e o ácido 5,5'ditio-bis 2 nitrobenzóico (DTNB), adicionado ao meio, formando um complexo amarelo. O tampão de ensaio foi composto por Tris-base (100 mM), DTNB (0,4 mM), acetil-CoA (1,24 mM), Triton X-100 1% (v/v) e o homogenato. A reação iniciou-se com a adição de oxaloacetato (18,9 mM) ao meio. O registro da cinética enzimática foi realizado a 25°C durante um intervalo de 10 minutos, em 412nm com o uso do aparelho Victor 3 1420 Multilabel Counter (PerkinElmer, EUA). O resultado da atividade da enzima foi expresso em valores de $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$.

3.6 Análise da Expressão Proteica

3.6.1 Extração Proteica

A quantificação das proteínas do trocador sódio/cálcio (NCX), retículo sarcoplasmático de cálcio 2 ATPase (SERCA2a ATPase), fosfolambam (PLB) e fosfo-fosfolambam (p-PLB) no músculo cardíaco foi analisada por *Western blot*. Para extração de proteínas totais do músculo cardíaco foi preparado um lisado celular utilizando-se o tampão de lise RIPA (50mM de Tris-HCl pH 7,4, 150mM de NaCl, 1mM de EDTA, 1% de NP-40, 0,25% de Na-deoxicolato) com inibidores de proteases (Sigma-Aldrich). Esta solução ficou em gelo por 15 minutos com agitações a cada 5 minutos no vortex, para completa lise das células. Posteriormente, o lisado foi centrifugado a 13.000 rpm, a 4°C, por 20 minutos. A concentração total de proteína do sobrenadante determinada através do método de Bradford. Foi analisada uma curva padrão com diluições seriadas de albumina bovina nas concentrações de 0 a 2mg/mL. Todas as amostras foram analisadas em duplicatas em uma placa de 96 poços. A um volume de 5µL das diluições de albumina e dos extratos proteicos diluídos 10 vezes foram adicionados 295µL do Coomassie Plus – The Better Bradford Assay™ Kit (Pierce, Rockford, IL). A placa foi incubada protegida da luz, por 10 minutos, a temperatura ambiente. A leitura da placa foi realizada a 595 nm no leitor de placas Biotrak II Plate Reader (GE Healthcare). Os valores das absorbâncias da curva padrão foram analisados em um gráfico, e as concentrações dos extratos protéicos determinadas a partir da equação da reta obtida.

3.6.2 Western Blot

Alíquotas com total de 30µg de proteína das amostras foram desnaturados a 95°C por 5 minutos com tampão de Laemmli 4X (7,5 % 2M Tris pH 6,8; 0,5% SDS; 5% azul de bromofenol; 26% glicerol; 16,5% de 2-mercaptoetanol), em um volume apropriado para a concentração final de 1x. Em seguida, as amostras foram separadas por eletroforese em gel de SDS-PAGE 12% em tampão de corrida Tris-Glicina (250 mM Tris, 1,92 M Glicina, 1% SDS). A corrida foi realizada a 70V durante 20 minutos e posteriormente a 100V por aproximadamente 2 horas. Após este período, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Pierce) por 50 minutos a 15V, utilizando-se o Trans-Blot SD *Semi-dry Transfer Cell* (Bio-Rad, Hercules, CA) e tampão de transferência (48mM Tris, 39mM Glicina, 0.0375% SDS e 20% de metanol). Em seguida, as membranas foram bloqueadas em solução de 5% de albumina sérica bovina/BSA em TBS-T (2,42g/L Tris-Base, 8 g/L NaCl, acrescidos de 0,1% de Tween-20, sob agitação, a 4°C, por 16 horas. A incubação com os anticorpos primários foi feita durante 1-2 horas a temperatura ambiente. Após sequência de lavagens de quatro vezes por 5 minutos com TBS-T e uma vez com TBS por 10 minutos, as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário fluorescente 1,5 h a temperatura ambiente. A detecção das proteínas na membrana foi realizada pelo sistema de detecção com fluorescência Infravermelha utilizando-se o aparelho Odyssey Fc System (LI-COR)

Os anticorpos utilizados no presente estudo foram: anti-SERCA2 ATPASE (MA3-919, Thermo Fisher); anti-Trocador Sódio/Cálcio (MA3-926, Thermo Fisher); anti-Fosfolambam (MA3-922, Thermo Fisher); anti-fosfo-fosfolambam (711401, Thermo Fisher); anti-GAPDH (MA5-15738, Thermo Fisher); IRDye 800CW Goat Anti-Mouse IgG; IRDye 800CW Goat Anti-Rabbit IgG.

3.6.3 Densitometria

As análises semi-quantitativas da expressão proteica foram determinadas por densitometria da intensidade das bandas do Western Blot. Utilizou-se a expressão da proteína GAPDH como controle de massa para a normalização dos resultados. As densitometrias foram realizadas utilizando o software ImageJ Launcher (Image Processing and Analysis in Java, National Institutes of Health, EUA).

3.7 Análise Estatística

Os dados contínuos são expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para verificar a distribuição normal dos dados. A comparação entre grupos foi realizada pelo teste *t* de Student não pareado ou Mann Whitney de acordo com a distribuição de normalidade. A comparação dentro do grupo foi testada pelo teste *t* pareado. As possíveis diferenças entre os grupos e as intervenções pré e pós foram testadas pela ANOVA de medidas repetidas. Em caso de diferença significativa, utilizou-se o teste post hoc de Fisher. A Correlação de Pearson foi realizada para testar a correlação entre parâmetros cardíacos e parâmetros moleculares (dados normais). Valores de probabilidade de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. Todas as análises foram realizadas utilizando STATISTICA 10.0 (StatSoft Inc., Oklahoma, EUA) e Microsoft Excel (Washington, EUA).

4. RESULTADOS

4.1 Impacto do Câncer de Mama na Função Cardíaca e Fenótipos Musculares Esqueléticos

4.1.1 Características Físicas

Para verificar se o câncer de mama influencia a função cardíaca e a musculatura esquelética, nós investigamos a função cardíaca, alguns fenótipos musculares esqueléticos e a capacidade física em camundongos MMTV-PyMT- e camundongos MMTV-PyMT+ de mesma idade. A seguir serão apresentadas as características físicas, a função cardíaca, os fenótipos do músculo esquelético e a capacidade física dessas duas linhagens de camundongos que carregam diferentes características genéticas.

Na Figura 2 são mostrados os dados de peso corporal dos camundongos MMTV-PyMT- e MMTV-PyMT+ ao longo das 15 semanas de seguimento. Observa-se que no início do estudo não havia diferença entre esses dois tipos de camundongos. Entretanto, a partir da 12^a semana o peso corporal dos camundongos MMTV-PyMT+ foi significativamente maior que a dos camundongos MMTV-PyMT- ($p=0,055$, Figura 2A). Esse aumento no peso corporal foi devido ao peso dos tumores, uma vez que a retirada dos tumores eliminou a diferença entre os grupos (Figura 2B).

Figura 2: Peso corporal durante o protocolo experimental em camundongos MMTV-PyMT- e MMTV-PyMT+. Observe que a partir da décima segunda semana o peso corporal tornou-se maior no grupo MMTV-PyMT+ (A) e que essa diferença desaparece quando é excluído o peso do tumor (B). Peso normalizado pelo comprimento da tíbia. Os números na tabela significam o número de camundongos ao longo das semanas (A). * Diferença significativa entre os grupos, $p \leq 0,05$. Teste *t* de Student não pareado.

Os dados de peso dos órgãos dos camundongos MMTV-PyMT- e MMTV-PyMT+ são mostrados na Tabela 1 e Figura 3. Observa-se que não há diferença no peso dos pulmões e gorduras marrom e branca entre os grupos. Entretanto, o peso do fígado ($p=0,0002$) e baço ($p=0,0003$) são maiores e o peso dos rins ($p=0,0005$) menores no grupo MMTV-PyMT+ comparados com o grupo MMTV-PyMT-.

Tabela 1: Peso dos órgãos e tumores em camundongos MMTV-PyMT- e MMTV-PyMT+.

ÓRGÃOS E TUMOR (g/cm)	MMTV-PyMT- (n=14)	MMTV-PyMT+ (n=15)	Valor p
Fígado	$0,548 \pm 0,016$	$0,716 \pm 0,034$ *	,0002
Baço	$0,039 \pm 0,002$	$0,070 \pm 0,007$ *	,0003
Rins	$0,149 \pm 0,005$	$0,128 \pm 0,003$ *	,0005
Gordura marrom	$0,035 \pm 0,003$	$0,031 \pm 0,003$	
Gordura branca	$0,091 \pm 0,008$	$0,068 \pm 0,008$	
Pulmão	$0,088 \pm 0,003$	$0,088 \pm 0,005$	
Tumores	-	$1,855 \pm 0,187$	

Observe que, com exceção dos pulmões e gorduras marrom e branca, os pesos dos órgãos são diferentes entre os camundongos MMTV-PyMT- e MMTV-PyMT+. Pesos normalizados pelo comprimento da tíbia. MMTV-PyMT (nº. por grupo). Média $\pm$ EPM. * Diferença significativa entre grupos, $p < 0,05$. Teste *t* de Student não pareado.

Figura 3: Peso de fígado (A), baço (B), rins (C), gorduras marrom e branca (D) e pulmões (E) em camundongos MMTV-PyMT- e MMTV-PyMT+. Pesos normalizados pelo comprimento da tíbia. * Diferença entre grupos, $p < 0,05$. Teste t de Student não pareado.

4.1.2 Morfologia e Função Cardíaca

A morfologia do coração foi semelhante entre os camundongos MMTV-PyMT- e o MMTV-PyMT+. Os diâmetros dos cardiomiócitos e a quantidade da área de colágeno das fibras tipo 1 e do tipo 3, e a soma dessas fibras foram semelhantes entre os grupos estudados (Tabela 2).

Tabela 2: Parâmetros morfológicos cardíacos através da medida dos diâmetros da fibra e quantificação da área de colágeno em MMTV-PyMT- e MMTV-PyMT+.

	MMTV-PyMT- (n=7)	MMTV-PyMT+ (n=8)
Diâmetro do miócito (μM)	18,37 $\pm$ 1,30	17,36 $\pm$ 0,71
Colágeno Tipo 1 (μM^2)	306,10 $\pm$ 71,52	361,24 $\pm$ 55,88
Colágeno Tipo 3 (μM^2)	531,84 $\pm$ 150,18	690,03 $\pm$ 149,07
Colágeno Tipo 1+3 (μM^2)	837,95 $\pm$ 186,58	1051,26 $\pm$ 191,02

Observe que os diâmetros dos cardiomiócitos e a quantidade de colágeno são semelhantes entre os camundongos MMTV-PyMT- e MMTV- PyMT+. MMTV- PyMT (nº de camundongos). Média $\pm$ EPM. Teste *t* de Student não pareado.

O DDFVE (p-grupo=0,003) e o VDF (p-grupo=0,008) foram menores no grupo MMTV-PyMT+ quando comparados ao grupo MMTV-PyMT-. O DSFVE e o VSF foram semelhantes entre os camundongos MMTV-PyMT- e MMTV-PyMT+. Em relação ao AE, esse parâmetro foi semelhante entre os grupos na condição basal. No período pós crescimento tumoral verificou-se que o AE diminuiu significativamente no grupo MMTV-PyMT+ (p-interação=0,010) (Tabela 3, Figura 4). A massa VE foi significativamente menor no grupo MMTV-PyMT+ quando comparado ao grupo MMTV-PyMT- (p-grupo=0,0003).

Em relação aos valores de E/E', MV des E e TRIV não foram verificadas diferenças entre os dois grupos no basal e no período pós condição experimental (Tabela 3). A FS, FE e IPM também foram semelhantes nos camundongos MMTV- PyMT- e MMTV-PyMT+ no basal e no período pós crescimento tumoral (Tabela 3).

Tabela 3: Parâmetros morfológicos e funcionais cardíacos em camundongos MMTV-PyMT- e MMTV-PyMT+ nas fases pré e pós do protocolo experimental.

		MMTV-PyMT– (n=11)		MMTV-PyMT+ (n=13)		
		Pré	Pós	Pré	Pós	Valor p
Morfologia						
DDFVE/peso (mm/g)		0,185 ± 0,006	0,168 ± 0,003	0,177 ± 0,004	0,151 ± 0,004	,003
DSFVE/peso (mm/g)		0,125 ± 0,007	0,112 ± 0,006	0,120 ± 0,005	0,096 ± 0,004	
Massa VE/peso (mg/g)		4,297 ± 0,266	3,396 ± 0,165	3,322 ± 0,128	3,043 ± 0,155	,0003
AE/peso (mm/g)		0,099 ± 0,004	0,091 ± 0,002	0,104 ± 0,002	0,079 ± 0,003* †	,010
Volumes						
VDF/peso (µl/g)		2,985 ± 0,136	2,637 ± 0,128	2,609 ± 0,096	2,451 ± 0,095	,008
VSF/peso (µl/g)		1,177 ± 0,124	1,006 ± 0,121	1,038 ± 0,087	0,841 ± 0,069	
Funcional						
E/E'		28,400 ± 1,569	26,135 ± 1,852	28,277 ± 1,750	26,712 ± 1,814	
Mv DES Ec (ms)		1,359 ± 0,159	1,374 ± 0,150	1,206 ± 0,114	1,376 ± 0,138	
TRIVc (ms)		1,456 ± 0,041	1,592 ± 0,071	1,519 ± 0,081	1,489 ± 0,070	
FC (bpm)		418 ± 9	435 ± 13	401 ± 12	428 ± 10	
FE (%)		62,405 ± 2,662	64,059 ± 3,138	60,819 ± 2,531	65,978 ± 2,34	
FS (%)		33,507 ± 2,025	34,796 ± 2,364	32,179 ± 1,836	36,146 ± 1,859	
IPM		15,601 ± 0,770	14,6 ±15 0,650	15,836 ± 0,619	14,786 ± 1,023	
ELR Strain (%)		18,429 ± 1,397	16,148 ± 1,928	20,196 ± 2,054	15,929 ± 1,137	
ELR Strain Rate (S ⁻¹)		4,818 ± 0,349	4,723 ± 0,364	4,373 ± 0,344	4,305 ± 0,388	
ELL Strain (%)		-14,413 ± 1,436	-14,451 ± 0,819	-12,439 ± 0,690	-9,757 ± 0,478	,002
ELL Strain Rate (S ⁻¹)		-5,069 ± 0,719	-6,033 ± 1,125	-4,391 ± 0,43	-3,656 ± 0,265	,041
ECR Strain (%)		21,917 ± 2,470	20,133 ± 2,319	23,566 ± 2,837	22,153 ± 1,839	
ECR Strain Rate (S ⁻¹)		5,449 ± 0,434	5,146 ± 0,352	4,883 ± 0,395	5,278 ± 0,375	
ECC Strain (%)		-17,926 ± 0,771	-16,545 ± 1,103	-17,508 ± 1,408	-18,854 ± 0,866	
ECC Strain Rate (S ⁻¹)		-5,565 ± 0,336	-4,961 ± 0,376	-5,28 ± 0,41	-5,406 ± 0,147	

Diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo (DDFVE); diâmetro sistólico final do ventrículo esquerdo (DSFVE); massa do ventrículo esquerdo (MassaVE); átrio esquerdo (AE); volume diastólico final (VDF) e volume sistólico final (VSF) do ventrículo esquerdo. Onda E/E' (E/E'); tempo de desaceleração da onda E (Mv des. E); tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV); frequência cardíaca (FC); fração de ejeção (FE); fração de encurtamento (FS); índice de performance miocárdica (IPM); eixo longo radial (ELR) *strain* e *strain rate*; eixo longo longitudinal (ELL) *strain* e *strain rate*; eixo curto radial (ECR) *strain* e *strain rate* e eixo curto circunferencial (ECC) *strain* e *strain rate*. MMTV-PYMT (nº. camundongos). Média ± EPM. DDFVE, p-grupo=0,003; VDF, p-grupo=0,008; AE, p-interação=0,010; massa do VE, p-grupo=0,0003; ELL *Strain*, p-grupo=0,002, ELL *Strain Rate*, p-grupo=0,41. Os parâmetros morfológicos foram corrigidos pelo peso. O Mv des. E e o TRIV foram corrigidos pela frequência cardíaca. * Diferença entre grupos, p=0,008; † Diferença dentro do grupo, p<0,0001. ANOVA medidas repetidas. Teste post hoc de Fisher.

Figura 4: Parâmetros morfológicos do coração em MMTV-PyMT- e MMTV-PyMT+ no início e final do protocolo experimental. Diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo (DDFVE) (A), volume diastólico final (VDF) (B), diâmetro sistólico final do ventrículo esquerdo (DSFVE) (C), volume sistólico final (VSF) do ventrículo esquerdo (D), átrio esquerdo (AE) (E) e massa do ventrículo esquerdo (MassaVE) (F). DDFVE, p-grupo=0,003; VDF, p-grupo=0,008; AE, p-interação=0,010, massa do VE, p-grupo=0,0003. Os parâmetros foram corrigidos pelo peso. * Diferença entre grupos, p=0,008; † Diferença dentro do grupo, p<0,0001. Animais/grupo: 10-11 MMTV-PyMT- e 12-13 MMTV-PyMT+. ANOVA de medidas repetidas, teste post hoc de Fisher.

O eixo longo sistólico radial não foi diferente entre os camundongos MMTV-PyMT- e MMTV-PyMT+. Não se verificaram diferenças nos *strain* e *strain rate* longos radiais entre os camundongos MMTV-PyMT- e MMTV-PyMT+ (Tabela 3). Entretanto, o *strain* (p-grupo=0,002) e o *strain rate* (p-grupo=0,041) longos longitudinais foram significativamente piores nos camundongos MMTV-PyMT+ quando comparados aos camundongos MMTV-PyMT- (Tabela 3, Figura 5). Os eixos curtos sistólicos radial e circunferencial foram semelhantes entre os grupos estudados. O *strain* e o *strain rate* curtos radiais, e o *strain* e o *strain rate* curtos circunferenciais foram semelhantes entre os camundongos MMTV-PyMT- e MMTV-PyMT+ (Tabela 3).

Figura 5: Parâmetros funcionais cardíacos em camundongos MMTV-PyMT- e MMTV-PyMT+, obtidos nas fases pré e pós protocolo experimental. *Strain* longitudinal (A); *Strain rate* longitudinal (B). *Strain*, p-grupo=0,002; *Strain Rate*, p-grupo=0,041. Animais/grupo: 11 MMTV-PyMT- and 12 MMTV-PyMT+ mice. ANOVA medidas repetidas.

4.1.2.1 Alterações Moleculares

Na tentativa de explicar as respostas de *strain* e *strain rate* longo longitudinal, nós investigamos proteínas envolvidas na modulação de cálcio do miócito cardíaco. O PLB total foi significativamente maior no grupo MMTV-PyMT+ (p<0,0001, Figura 6). A SERCA2a, o p-PLB e o NCX foram semelhantes entre os camundongos MMTV-PyMT- e MMTV-PyMT+. A razão entre as proteínas SERCA2a/PLB (p=0,009) foi significativamente reduzida em MMTV-PyMT+ comparados aos camundongos MMTV-PyMT- (Figura 6).

Análises adicionais mostraram que existe uma correlação inversa entre o PLB total e o *strain* do eixo longitudinal sistólico (r=-0,660; p=0,014, Figura 7).

Figura 6: Quantificação de proteínas reguladoras do cálcio intracelular no miócito cardíaco em MMTV-PyMT- e MMTV-PyMT+. Bandas do Western Blot (A); Fosfolambam (PLB) total (B); SERCA2a (C); fosfolambam fosforilado-p-PLB (D); trocador cálcio/sódio NCX (E) e razão SERCA2a/fosfolambam (SERCA2a/PLB) (F). O PLB foi maior ($p < 0,0001$) e a razão SERCA2a/PLB foi menor nos MMTV-PyMT+ em comparação com os MMTV-PyMT- ($p = 0,009$). Animais/grupo: 7 MMTV-PyMT- e 7 MMTV-PyMT+. * Diferença entre grupos, $p < 0,05$. Teste *t* de Student não pareado.

Figura 7: Correlação inversa entre a expressão de fosfolambam total (PLB) e o *strain* longitudinal ($r=-0,660$; $p=0,014$). Número de animais: 13 MMTV-PyMT- e MMTV-PyMT+. Correlação de Pearson.

4.1.3 Fenótipos do Músculo Esquelético

O peso dos músculos esqueléticos tibial anterior e sóleo foram menores em MMTV-PyMT+ comparados aos camundongos MMTV-PyMT- ($p=0,052$ e $p=0,050$, respectivamente, Figura 8).

Figura 8: Peso dos músculos esqueléticos tibial anterior (TA) e sóleo em camundongos MMTV-PyMT- e MMTV-PyMT+. Pesos normalizados pelo comprimento da tíbia. * Diferença entre grupos, tibial anterior, $p=0,052$ e sóleo, $p=0,050$. Animais/grupo: 12-13 MMTV-PyMT- e 14 MMTV-PyMT+. Teste t de Student não pareado.

4.1.3.1 Metabolismo Oxidativo

A atividade da enzima citrato sintase nos músculos esqueléticos tibial anterior (glicolítico) e sóleo (oxidativo) foi similar entre os grupos de camundongos (Figura 9).

Figura 9: Medida da atividade da enzima citrato sintase no músculo tibial anterior (A) e músculo sóleo (B) em MMTV-PyMT- e MMTV-PyMT+. Animais/grupo: 7 MMTV-PyMT- e 7 MMTV-PyMT+. Teste Mann Whitney (A) e teste *t* de Student não pareado (B).

4.1.3.2 Capacidade Física

Em relação à capacidade física, verificou-se na condição basal, que a distância percorrida, o tempo até a exaustão e a velocidade de corrida em TEmax foram semelhantes entre os grupos (Tabela 4). Após o período experimental, com crescimento tumoral no grupo MMTV-PyMT+, observou-se que a distância (*p*-grupo=0,006), o tempo de exercício (*p*-interação=0,041) e a velocidade na esteira (*p*-interação=0,048) foram significativamente menores no grupo MMTV-PyMT+ (Figura 10).

Tabela 4: Capacidade física avaliada pelo teste de esforço máximo em camundongos MMTV-PyMT- e MMTV-PyMT+ no início e no final do protocolo experimental.

	MMTV-PyMT- (n=13)		MMTV-PyMT+ (n=14)		Valor p
	Pré	Pós	Pré	Pós	
Distância (m)	703,40 ± 35,65	599,05 ± 62,33	653,15 ± 25,64	384,92 ± 50,14	,006
Tempo (min)	35,88 ± 0,95	32,87 ± 1,72	34,62 ± 0,66	25,67 ± 1,72 [†]	,041
Velocidade (m/min)	36,23 ± 0,93	33,69 ± 1,74	34,93 ± 0,74	26,57 ± 1,78 [†]	,048

MMTV-PyMT- e MMTV-PyMT+ (nº. camundongos). Média ± EPM. Distância, *p*-grupo=0,006; tempo, *p*-interação=0,041 e velocidade, *p*-interação=0,048. * Diferença entre grupos, tempo *p*=0,0004 e velocidade *p*=0,0006; † Diferença dentro do grupo, tempo *p*<0,0001 e velocidade, *p*=0,0002. ANOVA medidas repetidas. Teste post hoc de Fisher.

Figura 10: Capacidade física avaliada através de teste de esforço máximo (TEMax) em camundongos MMTV-PyMT- e MMTV-PyMT+, no início e final do protocolo experimental. Distância máxima percorrida (A), $p\text{-grupo}=0,006$; tempo, $p\text{-interação}=0,041$ (B) e velocidade, $p\text{-interação}=0,048$ (C). * Diferença entre grupos, tempo $p=0,0004$ e velocidade $p=0,0006$; † Diferença dentro do grupo, tempo $p<0,0001$ e velocidade, $p=0,0002$. Animais/grupo: 13 MMTV-PyMT- e 14 MMTV-PyMT+. ANOVA medidas repetidas. Teste post hoc de Fisher.

4.2 Efeito do Treinamento Físico na Função Cardíaca e Fenótipos Musculares Esqueléticos em Câncer de Mama

Para investigar se o treinamento físico previne alterações funcionais do coração provocadas pelo câncer de mama, camundongos MMTV-PyMT+ foram submetidos ao treinamento físico moderado em esteira.

4.2.1 Características Físicas

O treinamento físico não modificou o peso corporal ao longo de todo o estudo (Figura 11). Resultados semelhantes foram observados nos pesos de órgãos. O treinamento físico não modificou o peso do fígado, baço, rins, gordura marrom, gordura branca (perigonadal) e peso tumoral (Tabela 5).

Semanas	0	2	4	6	8	10	12	14
SED n = 9	9	9	9	8	5	5	3	3
TRE n = 12	12	12	12	12	12	8	8	4

Figura 11: Peso corporal em camundongos MMTV-PyMT+ treinados e sedentários - Números na tabela significam o número de camundongos ao longo das semanas. Animais/grupo: 13 MMTV-PyMT- e 14 MMTV-PyMT+ Teste *t* de Student não pareado.

Tabela 5: Peso de órgãos e tumores em camundongos MMTV-PyMT+ sedentários e treinados.

Orgãos e tumores (g/cm)	Sedentário (n=6)	Treinado (n=6)
Fígado	0,672 ± 0,026	0,682 ± 0,024
Baço	0,078 ± 0,012	0,060 ± 0,005
Rins	0,125 ± 0,005	0,122 ± 0,003
Gordura marrom	0,013 ± 0,003	0,014 ± 0,002
Gordura branca	0,065 ± 0,012	0,079 ± 0,020
Tumores	2,097 ± 0,330	1,979 ± 0,327

Média ± EPM. n = número de camundongos. Pesos normalizados pelo comprimento da tíbia. Teste *t* de Student não pareado.

O treinamento físico não modificou o crescimento tumoral. O tempo que o tumor atingiu a dimensão de 1cm³ e a idade em que isso ocorreu não foram diferentes entre os camundongos treinados e sedentários (Figura 12).

Figura 12: Tempo de desenvolvimento do tumor (A) e idade de desenvolvimento do tumor (B) em camundongos MMTV-PyMT+ treinados e sedentários. Animais/grupo: 9 MMTV-PyMT- e 12 MMTV-PyMT+. Teste *t* de Student não pareado

4.2.2 Morfologia e Função Cardíaca

Os valores morfológicos e funcionais cardíacos são apresentados na Tabela 6. O TF diminuiu significativamente o VDF (grupo $p=0,036$), mas não o VSF. O TF não causou efeito nas outras medidas avaliadas no ecocardiograma convencional (Figura 13).

Tabela 6: Parâmetros morfológicos e funcionais cardíacos em camundongos MMTV-PyMT+ treinados e sedentários nas fases pré e pós do protocolo experimental.

Sedentário (n=8)			Treinado (n=12)		Valor p
Pré	Pós	Pré	Pós		
Morfologia					
DDFVE/peso (mm/g)	0,182 ± 0,006	0,161 ± 0,005	0,175 ± 0,004	0,148 ± 0,004	
DSFVE/peso (mm/g)	0,120 ± 0,006	0,111 ± 0,004	0,113 ± 0,005	0,094 ± 0,005	
Massa VE/peso (mg/g)	0,010 ± 0,001	0,006 ± 0,001	0,009 ± 0,001	0,005 ± 4E-04	
AE/peso (mm/g)	0,103 ± 0,003	0,088 ± 0,003	0,100 ± 0,004	0,089 ± 0,002	
Volumes					
VDF/peso (µl/g)	2,740 ± 0,192	2,723 ± 0,166	2,485 ± 0,101	2,201 ± 0,156	,036
VSF/peso (µl/g)	1,050 ± 0,111	1,109 ± 0,068	0,925 ± 0,102	0,873 ± 0,096	
Funcional					
E/E'	-31,144 ± 2,148	-26,754 ± 1,432	-27,381± 1,939	-31,277 ± 3,222	
Mv des Ec (ms)	1,750 ± 0,205	1,291 ± 0,110	1,704 ± 0,194	1,427 ± 0,143	
TRIVc (ms)	1,688 ± 0,069	1,548 ± 0,068	1,548 ± 0,043	1,553 ± 0,066	
FC (bpm)	399 ± 15	424 ± 9	413 + 16	433 ± 6	
FE (%)	63,588 ± 2,358	59,104 ± 1,303	65,533 ± 2,355	63,044 ± 4,743	
FS (%)	34,075 ± 1,697	30,885 ± 0,929	35,422 ± 1,789	38,988 ± 3,361	
IPM	13,703 ± 0,797	14,601 ± 1,559	13,154 ± 0,583	13,122 ± 0,447	
ELR Strain (%)	17,81 ± 2,63	15,55 ± 1,99	18,36 ± 1,62	16,41 ± 1,91	
ELR Strain Rate (S ⁻¹)	5,29 ± 0,94	4,44 ± 0,38	4,53 ± 0,38	5,20 ± 0,56	
ELL Strain (%)	-14,16 ± 0,83	-11,42 ± 0,98	-12,95 ± 1,15	-16,38 ± 1,81	,068
ELL Strain Rate (S ⁻¹)	-4,39 ± 0,40	-3,78 ± 0,61	-4,41 ± 0,45	-5,75 ± 0,66*	,046
ECR Strain (%)	25,78 ± 2,20	20,52 ± 3,71	18,21 ± 2,11	21,06 ± 2,94	
ECR Strain Rate (S ⁻¹)	5,60 ± 0,46	5,11 ± 0,50	4,33 ± 0,31	5,51 ± 0,45	
ECC Strain (%)	-19,51 ± 0,76	-17,32 ± 1,38	-16,34 ± 0,84	-17,44 ± 1,25	
ECC Strain Rate (S ⁻¹)	-5,43 ± 0,19	-4,88 ± 0,28	-4,54 ± 0,20	-5,02 ± 0,34	

Diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (DDFVE); diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo (DSFVE); massa do ventrículo esquerdo (MassaVE); átrio esquerdo (AE); volume diastólico final (VDF) e volume sistólico final (VSF) do ventrículo esquerdo. Onda E/E' (E/E'); tempo de desaceleração da onda E (Mv des. E); tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV); frequência cardíaca (FC); fração de ejeção (FE); fração de encurtamento (FS); índice de performance miocárdica (IPM); eixo longo radial (ELR) *strain* e *strain rate*; eixo longo longitudinal (ELL) *strain* e *strain rate*; eixo curto radial (ECR) *strain* e *strain rate* e eixo curto circunferencial (ECC) *strain* e *strain rate*. Sedentário/treinado (nº de camundongo). Média ± EPM. VDF, p-grupo=0,036; ELL *Strain*, p-interação=0,068, ELL *Strain Rate*, p-interação=0,046. Os parâmetros morfológicos foram corrigidos pelo peso. O MV des. E e o TRIV foram corrigidos pela frequência cardíaca. * Diferença entre grupos, p=0,036. ANOVA medidas repetidas. Teste post hoc de Fisher

Figura 13: Parâmetros morfológicos do coração em MMTV-PyMT+ treinados e sedentários na fase pré e pós protocolo experimental. Diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo (DDFVE) (A); volume diastólico final (VDF) (B); diâmetro sistólico final do ventrículo esquerdo (DSFVE) (C); volume sistólico final (VSF) (D); átrio esquerdo (AE) (E) e; massa do ventrículo esquerdo (MassaVE) (F). Os parâmetros foram corrigidos pelo peso. VDF, p-grupo=0,03. Animais/grupo: 8 MMTV-PyMT- e 11 MMTV-PyMT+. ANOVA medidas repetidas.

O treinamento físico melhorou o *strain* longitudinal (p-interação=0,068) e melhorou significativamente o *strain rate* longitudinal (p-interação=0,046, Figura 14). Os eixos curtos sistólicos radial e circunferencial não foram modificados. O *strain* e o *strain rate* radial, e o *strain* e *strain rate* circunferencial foram semelhantes entre os dois grupos de camundongos estudados.

Figura 14: Eixo longo longitudinal sistólico *strain* (A) e eixo longo longitudinal sistólico *strain rate* (B), em camundongos MMTV-PyMT+ treinados e sedentários, obtidos nas fases pré e pós do protocolo experimental. O TF aumenta o *strain rate* longitudinal (interação $p=0,046$) e tende a aumentar o *strain* longitudinal (interação $p=0,068$). Animais/grupo: 8 sedentários (SED) e 11 treinados com exercícios (TRE). * Diferença entre grupos, $p=0,028$. ANOVA medidas repetidas, teste post hoc de Fisher.

4.2.2.1 Alterações Moleculares

O treinamento físico diminuiu significativamente o PLB total ($p<0,0001$) e aumentou significativamente a SERCA2a ($p<0,0001$), o NCX ($p=0,044$) e o p-PLB ($p=0,0001$, Figura 15). As razões das proteínas SERCA2a/PLB total e SERCA2a/NCX foram significativamente aumentadas pelo treinamento físico ($p<0,0001$).

Figura 15: Quantificação de proteínas reguladoras da via de cálcio no miócito cardíaco em MMTV-PyMT+ treinados e sedentários. Bandas do Western Blot (A); Fosfolambam (PLB)(B); SERCA2a (C); fosfolambam fosforilada (p-PLB) (D); trocador cálcio/sódio (NCX) (E); razão SERCA2a/fosfolambam (SERCA2a/PLB) (F) e razão SERCA2a/NCX (G). PLB ($p < 0,0001$), SERCA2a ($p < 0,0001$), NCX ($p = 0,044$), p-PLB ($p = 0,0001$), SERCA2a/PLB ($p < 0,0001$) e SERCA2a/NCX ($p < 0,0001$). * Diferença entre grupos, $p < 0,05$. Animais/grupo: 9 sedentários (SED) e 12 treinados (TRE). Teste t de Student não pareado.

Em análises adicionais, uma correlação inversa foi observada entre o PLB total e o *strain* longitudinal ($r = -0,486$, $p = 0,035$), e o PLB total e *strain rate* longitudinal ($r = -0,486$, $p = 0,035$). Correlações diretas foram encontradas entre a SERCA2a e o *strain* longitudinal ($r = 0,536$, $p = 0,018$), e a SERCA2a e o *strain rate* longitudinal ($r = 0,478$, $p = 0,038$), assim como, entre o NCX e o *strain rate* longitudinal ($r = 0,468$, $p = 0,043$, Figura 16).

Figura 16: Correlação inversa entre o fosfolambam total (PLB) e o *strain* longitudinal sistólico ($r=-0,486$, $p=0,035$, A), e o PLB total e o *strain rate* longitudinal sistólico ($r=-0,486$, $p=0,035$, B). Correlação direta entre a SERCA2a e o *strain* longitudinal sistólico ($r=0,536$, $p=0,018$, C), a SERCA2 e o *strain rate* longitudinal sistólico ($r=0,478$, $p=0,044$, D) e o NCX e o *strain rate* longitudinal sistólico ($r=0,468$, $p=0,043$, E). Número de animais: 19 sedentários (SED) e treinados (TRE). Correlação de Pearson.

4.2.4 Fenótipos Musculares Esqueléticos

O peso do músculo tibial anterior foi menor no grupo treinado comparado ao do grupo sedentário ($p=0,033$). Não houve diferença entre os grupos em relação ao peso do sóleo ($p=0,235$) (Figura 17).

Figura 17: Pesos dos músculos tibial anterior (TA) e sóleo em MMTV-PyMT+ sedentários e treinados. Pesos normalizados pelo comprimento da tíbia. Animais/grupo: 6 sedentários (SED) e 6 treinados com exercícios (TRE)* Diferença entre grupos, $p=0,033$. Teste t de Student não pareado.

4.2.4.1 Metabolismo Oxidativo

A enzima oxidativa citrato sintase no músculo esquelético são apresentadas a seguir (Figura 18). O treinamento físico aumentou a atividade da enzima citrato sintase no músculo glicolítico tibial anterior ($p<0,0001$) e no músculo oxidativo sóleo ($p<0,0001$).

Figura 18: Medida da atividade da enzima citrato sintase nos músculos tibial anterior (A) e sóleo (B) em MMTV-PyMT+ sedentários e treinados. Teste Mann Whitney (A) e teste t de Student não pareado (B). Animais/grupo: 9 sedentários (SED) e 11 treinados com exercícios (TRE)* Diferença entre grupos, $p<0,0001$.

4.2.4.2 Capacidade Física

Os resultados da distância percorrida durante o teste de exercício progressivo máximo são mostrados na Figura 19. Observa-se que a distância percorrida foi semelhante entre os camundongos selecionados para os grupos sedentários e treinados no início do estudo. Após um mês de estudo, o TF tendeu a impedir a redução da capacidade física provocada pelo câncer (Figura 19). Do segundo ao terceiro mês, a distância percorrida diminuiu progressivamente nos camundongos sedentários e treinados. Não houve diferença entre os grupos estudados.

Meses	0	1	2	3
SED n = 9	9	9	8	5
TRE n = 12	12	12	12	11

Figura 19: Capacidade física avaliada através da distância máxima percorrida em TEmax em camundongos MMTV-PyMT+ treinados e sedentários no período de 3 meses do protocolo experimental. Números na tabela significam o número de camundongos ao longo dos meses. Teste *t* de Student não pareado.

4.3 Resumo dos resultados

Efeitos do câncer						
Características Físicas		Peso corpo ↔	Gordura ↔	Fígado ↑	Baço ↑	Rins ↑ Pulmões ↔
Coração	Morfologia	DDVE ↓ VDF ↓ AE ↓ Massa VE ↓				
	Função	Strain ↓ StrainRate ↓				
	Histologia	Diâmetro ↔ Colágeno ↔				
	Molecular	PBL ↑ SERCA2a/PLB ↓ PLB/Strain				
Músculo Esquelét.	Massa	TA ↓ Sóleo ↓				
	Capacidade Física	Tolerância ao esforço ↓				
	Metabol.	Citrato Sintase TA ↔ Sóleo ↔				

Efeitos do Treinamento Físico						
Características Físicas		Peso corpo ↔	Gordura ↔	Fígado ↔	Baço ↔	Rins ↔ Pulmões ↔
Coração	Morfologia	DDVE ↔ VDF ↓ AE ↔ Massa VE ↔				
	Função	Strain ±↑ Strain Rate ↑				
	Molecular	PBL ↓	SERCA2a ↑	p-PLB ↑	NCX ↑	SERCA2a/PLB ↑ SERCA2a/NCX↑
Músculo Esquelét	Massa	TA ↓ Sóleo ↔				
	Capacidade Física	Tolerância ao esforço ↔				
	Metabol.	Citrato Sintase TA ↑ Sóleo ↑				

5. DISCUSSÃO

Os principais e novos achados do presente estudo são: 1) O câncer de mama causa diminuição na capacidade física em camundongos MMTV-PyMT+; 2) O câncer de mama nesse modelo altera o *strain* e *strain rate* longitudinal do ventrículo esquerdo, o que está associado ao aumento na expressão de PLB; 3) O treinamento físico previne as alterações no *strain* e *strain rate* longitudinal do ventrículo esquerdo; 4) O treinamento físico melhora a expressão de proteínas envolvidas na modulação de cálcio.

5.1 Impacto do Câncer de Mama

Evidências crescentes mostram diminuição da capacidade física em sobreviventes de câncer de mama (BETOF et al., 2015). Essa alteração fisiológica tem sido atribuída à inatividade física e aos efeitos da medicação no tratamento da doença (LAKOSKI et al., 2014). Após o diagnóstico, a maioria dos pacientes tende a se tornar mais inativa, o que contribui para a redução da capacidade física. Além disso, alterações nos sistemas pulmonar, cardiovascular, hematológico e esqueléticos têm sido documentadas em pacientes submetidas à quimioterapia para o tratamento do câncer de mama (GUIGNI et al., 2013; PEEL et al., 2014). Mais importante ainda é o fato que essas alterações podem persistir por até sete anos após o final do tratamento (LAKOSKI et al., 2014). A redução da capacidade física tem implicações clínicas significativas, incluindo diminuição da qualidade de vida e aumento da mortalidade (BARLOW et al., 2012; MYERS, 2003). O nosso estudo em modelo transgênico de câncer de mama está alinhado com essas observações. O câncer de mama diminuiu a capacidade física.

A avaliação da função ventricular pelo *speckle tracking* tem sido muito utilizada na prática clínica. Alterações longitudinais na deformação ventricular têm sido utilizadas como detecção do comprometimento ventricular precoce, antes mesmo das alterações nas deformações circunferenciais e radiais, com alta sensibilidade e especificidade. Além disso, a deformação longitudinal apresenta um alto valor prognóstico de cardiotoxicidade (NEGISHI et al., 2013), mesmo na presença de fração de ejeção preservada (BLOOM et al., 2017).

O nosso estudo mostra pela primeira vez que o câncer de mama, sem a influência do tratamento, está associado ao comprometimento do *strain* e do *strain rate* longitudinal do ventrículo esquerdo, ambos consistentes com uma disfunção miocárdica subclínica (NAHUM et al., 2010). Além disso, o nosso estudo mostra que essas alterações miocárdicas estão associadas a um aumento na expressão de PLB total e a uma

diminuição na razão SERCA2a/PLB no miócito cardíaco de camundongos MMTV-PyMT+, ambos compatíveis com alteração no manuseio de cálcio no miocárdio. Essa ideia é ainda mais fortalecida pela correlação inversa significativa entre o *strain* longitudinal e a expressão de PLB ($r=-0,660$; $p=0,014$). As proteínas relacionadas ao cálcio desempenham um papel importante na contração e no relaxamento do miocárdio. O PLB se liga à SERCA2a em um complexo regulador heterodimérico 1:1, que resulta na inibição da atividade da bomba de SERCA2a (CANTILINA et al., 1993; SASAKI et al., 1992). Essa resposta reduz a recaptção de cálcio no retículo sarcoplasmático durante a fase de relaxamento muscular e a carga de cálcio necessária para a contração miocárdica no ciclo cardíaco subsequente (DÍAZ et al., 2005), o que poderia explicar o comprometimento na deformação longitudinal do ventrículo esquerdo. Embora os nossos achados não estabeleçam uma relação definitiva de causa e efeito entre essas respostas, eles sugerem que a desregulação na via de sinalização de cálcio desempenha, pelo menos em parte, um papel na disfunção cardíaca induzida por câncer de mama.

Estudos anteriores mostraram que a quimioterapia usada como padrão de tratamento do câncer de mama está associada à cardiotoxicidade (BLOOM et al., 2017; JONES et al., 2007). Alterações no intervalo QT (ACCORDINO; NEUGUT; HERSHMAN, 2014; BUZA; RAJAGOPALAN; CURTIS, 2017), arritmias ventriculares (BUZA; RAJAGOPALAN; CURTIS, 2017; FARMAKIS; PARISSIS; FILIPPATOS, 2014), síndrome coronariana aguda (HERRMANN et al., 2016; PERETTO et al., 2017) e disfunção sistólica e diastólica do ventrículo esquerdo têm sido descritas em pacientes submetidos à quimioterapia. Além disso, sugere-se que alguns fatores de risco cardiovascular não relacionados ao câncer, incluindo idade, sexo, tabaco, hipertensão, diabetes e doença renal crônica (XIE et al., 2015), podem aumentar o risco de doenças cardiovasculares provocadas por exposição à quimioterapia ou radioterapia (JONES et al., 2007). Nosso estudo amplia o conhecimento em relação à associação do câncer de mama e doenças cardiovasculares. O nosso paradigma baseado em camundongos MMTV-PyMT nos permitiu investigar o impacto do câncer de mama, *per se*, na função cardíaca. Descobrimos que o câncer de mama provoca prejuízo no *strain* e no *strain rate* longitudinal sistólico do eixo longo do ventrículo esquerdo. Essa alteração subclínica é consistente com o câncer de mama como uma doença sistêmica. Além disso, ela vincula o câncer de mama ao aumento do risco de doenças cardiovasculares. Essas descobertas abrem uma nova janela de investigações nessa área.

Outra informação interessante em nosso estudo é a alteração na morfologia cardíaca causada pelo câncer de mama. A detecção de reduções no diâmetro e volume

do VE associados a menor massa do VE e átrio esquerdo é sugestiva de remodelamento cardíaco em consequência do câncer de mama. Essas respostas predispõem à progressão da disfunção ventricular e arritmias malignas (AZEVEDO et al., 2016). Além disso, estão associados a um mau prognóstico (AZEVEDO et al., 2016). Estudo anterior sugere disfunção cardíaca causada por perda de massa cardíaca na caquexia do câncer (SPRINGER et al., 2014). Embora o câncer de mama não seja caracterizado como um câncer caquético, sarcopenia foi observada em 25% das pacientes com câncer de mama metastático (ROSSI et al., 2019; WANG et al., 2017). Apesar da redução na morfologia cardíaca, não encontramos alterações no diâmetro dos cardiomiócitos e na fibrose. Essas adaptações histológicas parecem ocorrer como um evento de compensação tardia, juntamente com manifestações de disfunção cardíaca clínica evidente, como queda na FE e FS (SPRINGER et al., 2014).

Além da disfunção cardíaca, nossas descobertas no modelo de camundongo MMTV-PyMT destacam que os efeitos sistêmicos do câncer afetam outros órgãos. Ele provoca aumentos nas dimensões do fígado e do baço e diminuição dos rins. Apesar de não terem sido realizados estudos funcionais nesses órgãos, a hepatomegalia e a atrofia renal são sinais bem estabelecidos de disfunção orgânica (COLLETT et al., 2015; GONCALVESOVÁ, 2014). Além disso, a esplenomegalia tem sido associada a alterações na função imunológica (MU et al., 2010; ZANETTI; CASTIGLIONI; INGULLI, 2010) que podem afetar ainda mais o prognóstico (Marshall, 2008). Além disso, Hodgson et al (2016) observaram que o crescimento do baço foi positivamente correlacionado com o desenvolvimento do tumor do cólon, em camundongos *Apcmin716/+* (HODGSON et al., 2016). O aumento do baço associou-se com o aumento da porcentagem de linfócitos T CD3 + e linfócitos T CD8 + (FANG et al., 2014).

Alguns pesquisadores afirmam que o câncer de mama está associado à obesidade (ALIKHANI; FERGUSON; NOVOSYADLYY, 2014; BENN et al., 2016). De fato, pacientes obesos são mais suscetíveis ao aumento dos níveis de estrogênio devido à aromatização excessiva do tecido adiposo, super expressão de citocinas pró-inflamatórias, resistência à insulina, fatores de crescimento da hiperativação da insulina (IGFs), adipócitos-adipocinas, hipercolesterolemia e estresse oxidativo. Além disso, níveis aumentados de colesterol no plasma predispõem ao crescimento do tumor (ENGIN, 2017). Sabe-se também que pacientes com câncer de mama são propensos a desenvolver obesidade sarcopênica, em que a massa de gordura predominantemente visceral é aumentada e a massa corporal magra é diminuída (GUINAN et al., 2014). No presente estudo, o peso corporal sem a influência do peso do tumor não foi alterado. Também não foram

observadas alterações na gordura marrom e na gordura branca. A explicação para essa aparente divergência entre os nossos resultados e aqueles de outros estudos que mostraram aumento na gordura corporal decorrente do câncer está fora do escopo do nosso estudo. É possível que tal diferença se deva ao efeito do tratamento para o câncer. Muitos dos estudos foram conduzidos em humanos durante a vigência do tratamento com antraciclinas, enquanto o nosso estudo foi conduzido em modelo transgênico de câncer de mama, livre de tratamento. Por outro lado, encontramos massa muscular diminuída, tanto no músculo tibial anterior (glicolítico), quanto no músculo sóleo (oxidativo), em camundongos com câncer, apesar desses animais não apresentarem alteração na atividade da enzima citrato sintase. Esses achados são sugestivos de que o modelo experimental de câncer de mama investigado não apresenta miopatia esquelética funcional. É evidente que a nossa investigação sobre o impacto do câncer nos fenótipos musculares esqueléticos foi pouco aprofundada. Contudo, esses nossos achados, no mínimo, abrem perspectivas para outras investigações. Outras vias relacionadas ao metabolismo energético devem ser mais bem exploradas.

5.2 Efeitos do Treinamento Físico

O exercício moderado não modificou o peso do baço, fígado, rins e músculo sóleo (oxidativo) em camundongos MMTV-PyMT+. Parte desse desfecho pode ser atribuído ao estágio avançado do câncer de mama, levando o organismo a uma sobrecarga sistêmica não recuperável pelo TF. Entretanto, o nosso paradigma baseado em sessões de exercício diário, provocou aumento significativo na atividade da enzima citrato sintase, tanto no músculo glicolítico, quanto no músculo oxidativo. A citrato sintase controla a primeira etapa do Ciclo de Krebs, localizada no interior da matriz mitocondrial e está diretamente associada com a eficiência da via de sinalização oxidativa celular (USHER et al., 1994). Supreendentemente, o TF aeróbio moderado diminuiu o peso do músculo tibial anterior, já alterado pelo câncer em estágio avançado. De fato, conhecimentos adquiridos em outros estudos mostram que a resposta do músculo glicolítico difere daquela do músculo oxidativo frente ao estímulo caquético. Alguns investigadores, estudando modelo de caquexia induzida pelo infarto do miocárdio em ratos, verificaram que as vias moleculares relacionadas à autofagia estão aumentadas no músculo plantar (glicolítico), mas não no músculo sóleo (oxidativo) (JANNIG et al., 2014).

Estudos realizados pelo nosso grupo demonstrou anteriormente que o treinamento físico melhora o equilíbrio líquido das proteínas cardíacas relacionadas ao manuseio de cálcio na insuficiência cardíaca (ROLIM et al., 2007). Achados semelhantes foram

observados em modelo de ratos obesos (PAULINO et al., 2010). O TF reduz a expressão das proteínas p-PLB^{Thr17} e p-Ryanodina^{Ser2808} cardíacas, o que melhora a função cardíaca (PAULINO et al., 2010). No presente estudo ficou evidenciado pela primeira vez que o TF evita o comprometimento do *strain* e *strain rate* longitudinal do ventrículo esquerdo em camundongos MMTV-PyMT+. Ele mostrou também a diminuição da expressão de PLB total e aumento da expressão de SERCA2a, NCX e p-PLB em camundongos MMTV-PyMT+ submetidos ao TF. Finalmente, o *strain* ($r=-0,486$, $p=0,035$) e o *strain rate* longitudinal ($r=-0,486$, $p=0,035$) foram inversamente correlacionados com o PLB, e o *strain* longitudinal ($r=0,536$, $p=0,018$) e o *strain rate* longitudinal ($r=0,478$, $p=0,044$) diretamente correlacionados com a SERCA2a, e o *strain rate* longitudinal com o NCX ($r=0,468$, $p=0,043$). Em um estudo recente, alguns pesquisadores relataram que o TF reduziu o conteúdo da proteína PLB em ratos do tipo selvagem (PAULINO et al., 2010). Essa resposta foi abolida em camundongos transgênicos da proteína quinase alfa 2 ativada. Essas respostas ao TF recupera a dinâmica de relaxamento ventricular e subsequente contração no ciclo cardíaco, compartilhando uma melhora da funcionalidade cardíaca neste modelo animal.

Ao contrário da contribuição molecular do TF, as alterações morfológicas cardíacas provocadas pelo câncer de mama, como a redução no diâmetro e volume do VE associados a menor massa do VE e átrio esquerdo, não foram alterados pelo TF.

O TF também tendeu evitar o declínio na tolerância ao exercício. No entanto, esse efeito foi observado apenas no primeiro mês de estudo. Após esse período, a tolerância ao exercício foi semelhante em camundongos treinados e sedentários. Esses achados demonstram que as adaptações cardíacas ocorrem independentemente da melhora da capacidade física.

Nós verificamos que o TF provocou melhora significativa na atividade da enzima citrato sintase. Essa resposta metabólica do músculo esquelético tem importantes implicações. Primeiro, evidencia a efetividade do nosso paradigma de exercício físico para o modelo experimental de câncer de mama. Segundo, sugere que o TF é uma conduta relevante para evitar possíveis alterações na musculatura esquelética provocadas pelo estágio avançado de alguns tipos de câncer, especialmente aqueles relacionados à caquexia.

5.3 Limitações do estudo

Seguindo as orientações das Diretrizes Institucionais do Cuidado Animal, os camundongos foram eutanasiados quando o tumor atingiu 1 cm³, o que nos impediu de avaliar o efeito do câncer de mama durante um período clínico mais prolongado e em estágios mais avançados da doença.

O estudo foi inteiramente realizado em animais, o que limita sua extrapolação a humanos com câncer de mama. No entanto, o camundongo MMTV-PyMT é um modelo transgênico exclusivo de adenocarcinoma de mama multifocal, cujo desenvolvimento do câncer ocorre de maneira semelhante à do carcinoma ductal invasivo da mama humana. O câncer se desenvolve espontaneamente e progride gradualmente de hiperplasia, displasia, adenoma e carcinoma devido à expressão da oncoproteína média do poliovírus (PyMT) (LIN et al., 2003). Além disso, a morfologia do tumor e a expressão de biomarcadores no tumor PyMT são muito semelhantes às do câncer de mama humano. Portanto, estamos confiantes de que o nosso estudo fornecerá informações importantes que serão úteis para futuras investigações com o objetivo de validar os nossos achados no cenário clínico.

6. CONCLUSÃO

O câncer de mama causa disfunção ventricular esquerda subclínica em camundongos MMTV-PyMT+, que está diretamente associada à desregulação do manuseio do cálcio no miócito cardíaco. O treinamento físico evita a disfunção ventricular subclínica, o que é, pelo menos em parte, devida a uma melhora no manuseio intracelular de cálcio cardíaco. Esses achados demonstram o impacto sistêmico do câncer na homeostase corporal e destacam o benefício do treinamento físico no cenário oncológico.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACCORDINO, M. K.; NEUGUT, A. I.; HERSHMAN, D. L. Cardiac effects of anticancer therapy in the elderly. **Journal of Clinical Oncology**, v. 32, n. 24, p. 2654–2661, 2014.
- AKRAM, M. et al. Awareness and current knowledge of breast cancer. **Biological Research**, v. 50, n. 1, p. 1–23, 2017.
- ALEGRE, M. M. et al. MINI-REVIEW Mechanics behind Breast Cancer Prevention - Focus on Obesity , Exercise and Dietary Fat. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 14, p. 2207–2212, 2013.
- ALIKHANI, N.; FERGUSON, R. D.; NOVOSYADLYY, R. NIH Public Access. **National Institutes of Health**, v. 32, n. 8, p. 961–967, 2014.
- ALMEIDA, P. W. M. et al. Swim training suppresses tumor growth in mice. **Journal of Applied Physiology**, v. 107, n. 1, p. 261–265, jul. 2009.
- ALP, P. R.; NEWSHOLME, E. A.; ZAMMIT, V. A. Activities of citrate synthase and NAD⁺ linked and NADP⁺ linked isocitrate dehydrogenase in muscle from vertebrates and invertebrates. **Biochemical Journal**, v. 154, n. 3, p. 689–700, 1976.
- AOI, W. et al. A novel myokine, secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC), suppresses colon tumorigenesis via regular exercise. **Gut**, v. 62, n. 6, p. 882–889, 2013.
- ARUN, G. et al. Differentiation of mammary tumors and reduction in metastasis upon Malat1 lncRNA loss. **Genes and Development**, v. 30, n. 1, p. 34–51, 2016.
- AZEVEDO, P. S. et al. Cardiac Remodeling: Concepts, Clinical Impact, Pathophysiological Mechanisms and Pharmacologic Treatment. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 106, n. 1, p. 62–69, 2016.
- BALKWILL, F. CANCER AND THE CHEMOKINE NETWORK. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, p. 540–550, 2004.
- BALLARD-BARBASH, R. et al. Physical activity, biomarkers, and disease outcomes in cancer survivors: A systematic review. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 104, n. 11, p. 815–840, 2012.
- BARLOW, C. E. et al. Cardiorespiratory Fitness and Long-Term Survival in “Low-Risk” Adults. **Journal of the American Heart Association**, v. 1, n. 4, p. 1–6, 2012.
- BARNARD, R. J. et al. A mechanism to explain how regular exercise might reduce the risk for clinical prostate cancer. **European Journal of Cancer Prevention**, v. 16, n. 5, p. 415–421, 2007.
- BEHRENS, G. et al. The association between physical activity and gastroesophageal cancer: Systematic review and meta-analysis. **European Journal of Epidemiology**, v. 29, n. 3, p. 151–170, 2014.
- BEHRENS, G.; LEITZMANN, M. F. The association between physical activity and renal cancer: systematic review and meta-analysis. **British Journal of Cancer**, v. 108, p. 798–811, 2013.

- BENN, M. et al. High body mass index and cancer risk — a Mendelian randomisation study. **European Journal of Epidemiology**, p. 14, 2016.
- BENZIANE, B. et al. Divergent cell signaling after short-term intensified endurance training in human skeletal muscle. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 295, p. 1427–1438, 2008.
- BERNSTEIN, L. et al. Physical exercise and reduced risk of breast cancer in young women. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 86, n. 18, p. 1403–1408, 1994.
- BERNSTEIN, L. Exercise and breast cancer prevention. **Current Oncology Reports**, v. 11, n. 6, p. 490–496, 2009.
- BETOF, A. S. et al. Modulation of murine breast tumor vascularity, hypoxia, and chemotherapeutic response by exercise. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 107, n. 5, p. 1–5, 1 maio 2015.
- BLOOM, M. W. et al. Cancer Therapy-Related Cardiac Dysfunction and Heart Failure Part 1: Definitions, Pathophysiology, Risk Factors, and Imaging. **Circ Heart Fail**, v. 9, n. 1, p. 1–21, 2017.
- BOUCHARD, C. et al. Genomic predictors of the maximal O₂ uptake response to standardized exercise training programs. **Journal of Applied Physiology**, v. 110, p. 1160–1170, 2011.
- BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 7 maio 1976.
- BRENNER, D. R. et al. Lung Cancer - Leisure-time physical activity and lung cancer risk : A systematic review and meta-analysis. **Elsevier**, v. 95, p. 17–27, 2016.
- BUZA, V.; RAJAGOPALAN, B.; CURTIS, A. B. Cancer Treatment-Induced Arrhythmias: Focus on Chemotherapy and Targeted Therapies. **Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology**, v. 10, n. 8, p. 1–13, 2017.
- CANTILINA, T. et al. Comparative Studies of Cardiac and Skeletal Sarcoplasmic Reticulum ATPases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 23, p. 17018–17025, 1993.
- CARTEE, G. D. et al. Exercise Promotes Healthy Aging of Skeletal Muscle. **Cell Metab.**, v. 23, n. 6, p. 1034–1047, 2017.
- CHEN, D. et al. Cancer Affects microRNA Expression , Release , and Function in Cardiac and Skeletal Muscle. **Cancer Research**, v. 74, n. 16, p. 4270–4282, 2014.
- CHOW, A. Y. et al. Anthracyclines cause endothelial injury in pediatric cancer patients: A pilot study. **Journal of Clinical Oncology**, v. 24, n. 6, p. 925–928, 2006.
- CIRQUEIRA, M. B. et al. Subtipos moleculares do câncer de mama. **Femina**, v. 39, p. 499–503, 2011.
- COLLETT, J. A. et al. Kidney-specific reduction of oxidative phosphorylation genes derived from spontaneously hypertensive rat. **PLoS ONE**, v. 10, n. 8, p. 1–19, 2015.

DE LUCIA, C. et al. Echocardiographic Strain Analysis for the Early Detection of Left Ventricular Systolic/Diastolic Dysfunction and Dyssynchrony in a Mouse Model of Physiological Aging. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, v. 74, n. 4, p. 455–461, 2019.

DEMARK-WAHNEFRIED, W.; CAMPBELL, K. L.; HAYES, S. C. Weight management and its role in breast cancer rehabilitation. **National Institutes of Health**, v. 118, n. 80, 2012.

DÍAZ, M. E. et al. The control of sarcoplasmic reticulum Ca content in cardiac muscle. **Cell Calcium**, v. 38, n. 3- 4 SPEC. ISS., p. 391–396, 2005.

DUIVENVOORDEN, H. M. et al. Discriminating the earliest stages of mammary carcinoma using myoepithelial and proliferative markers. **PLoS ONE**, v. 13, n. 7, p. 1–12, 2018.

ENGIN, A. Obesity-associated breast cancer: Analysis of risk factors. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 960, p. 571–606, 2017.

ESCH, B. T. A. et al. Diastolic ventricular interactions in endurance-trained athletes during orthostatic stress. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 293, p. 409–415, 2006.

FANG, J. J. et al. Effect of spleen lymphocytes on the splenomegaly in hepatocellular carcinoma-bearing mice. **Biomedical and Environmental Sciences**, v. 27, n. 1, p. 17–26, 2014.

FANTOZZI, A.; CHRISTOFORI, G. Mouse models of breast cancer metastasis. **Breast Cancer Research**, v. 8, n. 4, 2006.

FARMAKIS, D.; PARISSIS, J.; FILIPPATOS, G. Insights into onco-cardiology: Atrial fibrillation in cancer. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 63, n. 10, p. 945–953, 2014.

FARRIS, M. S. et al. The association between leisure time physical activity and pancreatic cancer risk in adults: A systematic review and meta-analysis. **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**, v. 24, n. 10, p. 1462–1473, 2015.

FERGUSON, S. et al. Cardiac performance in endurance-trained and moderately active young women. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 33, n. 7, p. 1114–1119, 2001.

FERREIRA, J. C. B. et al. Maximal lactate steady state in running mice: Effect of exercise training. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 34, n. 8, p. 760–765, 2007.

FRIEDENREICH, C. M. et al. Alberta physical activity and breast cancer prevention trial: Sex hormone changes in a year-long exercise intervention among postmenopausal women. **Journal of Clinical Oncology**, v. 28, n. 9, p. 1458–1466, 20 mar. 2010.

GABRIEL, B. M.; ZIERATH, J. R. The Limits of Exercise Physiology: From Performance to Health. **Cell Metabolism**, v. 25, n. 5, p. 1000–1011, 2017.

GLOBOCAN. **Age standardized (World) incidence rates, breast, all ages**. Disponível em: <<http://gco.iarc.fr/today>>. Acesso em: 6 out. 2019.

GOH, J. et al. Exercise Training in Transgenic Mice Is Associated with Attenuation of Early

Breast Cancer Growth in a Dose-Dependent Manner. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, 2013.

GONCALVESOVÁ, E. [Liver in heart failure]. **Vnitřní lékařství**, v. 60, n. 4, p. 298–303, abr. 2014.

GUIGNI, B. A. et al. Skeletal Muscle Atrophy and Dysfunction in Breast Cancer Patients: Role for Chemotherapy-Derived Oxidant Stress. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 53, n. 9, p. 1689–1699, 2013.

GUINAN, E. M. et al. The Development of the Metabolic Syndrome and Insulin Resistance After Adjuvant Treatment for Breast Cancer. **Cancer Nursing**, v. 37, n. 5, p. 355–362, 2014.

GUY, C. T.; CARDIFF, R. D.; MULLER, W. J. Induction of mammary tumors by expression of polyomavirus middle T oncogene: a transgenic mouse model for metastatic disease. **Molecular and Cellular Biology**, v. 12, n. 3, p. 954–961, 1992.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The Hallmarks of Cancer Review Douglas. **Cell**, v. 100, n. 7, p. 57–70, 2000.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.

HERRMANN, J. et al. Response by Herrmann et al to Letter Regarding Article, “vascular Toxicities of Cancer Therapies: The Old and the New - An Evolving Avenue”. **Circulation**, v. 133, n. 13, p. 1272–1289, 2016.

HERSCHKOWITZ, J. I. et al. Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. **Genome Biology**, v. 8, n. 5, p. 1–17, 2007.

HERSHMAN, D. L. et al. Association of cardiovascular risk factors with cardiac events and survival outcomes among patients with breast cancer enrolled in SWOG clinical trials. **Journal of Clinical Oncology**, v. 36, n. 26, p. 2710–2717, 2018.

HIGGINS, K. A. et al. Findings From a Mouse Model. **Cancer**, v. 120, n. 21, p. 3302–3310, 2015.

HODGSON, A. et al. Ultrasound imaging of splenomegaly as a proxy to monitor colon tumor development in Apcmin716/+mice. **Cancer Medicine**, v. 5, n. 9, p. 2469–2476, 2016.

HOJMAN, P. et al. Exercise-induced muscle-derived cytokines inhibit mammary cancer cell growth. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 301, n. 3, p. 504–510, 2011.

HOJMAN, P. et al. Molecular Mechanisms Linking Exercise to Cancer Prevention and Treatment. **Cell Metabolism**, v. 27, n. 1, p. 10–21, 2018.

INCA. **Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2017.

INCA. **Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2019.

JANNIG, P. R. et al. Autophagy signaling in skeletal muscle of infarcted rats. **PLoS ONE**,

v. 9, n. 1, p. 1–12, 2014.

JIA, W. et al. The role of claudin-5 in blood-brain barrier (BBB) and brain metastases (Review). **Molecular Medicine Reports**, v. 9, n. 3, p. 779–785, 2014.

JIANG, W.; ZHU, Z.; THOMPSON, H. J. Effects of physical activity and restricted energy intake on chemically induced mammary carcinogenesis. **Cancer Prevention Research**, v. 2, n. 4, p. 338–344, abr. 2009.

JONES, L. W. et al. Early Breast Cancer Therapy and Cardiovascular Injury. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 50, n. 15, p. 1435–1441, 2007.

JONES, L. W. et al. Effect of aerobic exercise on tumor physiology in an animal model of human breast cancer. **Journal of Applied Physiology**, v. 108, n. 2, p. 343–348, 2010.

JONES, L. W. et al. Cardiopulmonary Function and Age-Related Decline Across the Breast Cancer Survivorship Continuum. **Journal of Clinical Oncology**, v. 30, n. 20, 2012.

JU, J. et al. Voluntary exercise inhibits intestinal tumorigenesis in Apc(Min/+) mice and azoxymethane/dextran sulfate sodium-treated mice. **BMC cancer**, v. 8, p. 316, 2008.

JUNQUEIRA, L. C. U.; BIGNOLAS, G.; BRENTANI, R. R. Picrosirius staining plus polarization microscopy , a specific method for collagen detection in tissue sections. **Histochemicat Journal**, v. 11, p. 447–455, 1979.

KALAANY, N. Y.; SABATINI, D. M. Tumours with PI3K activation are resistant to dietary restriction. **Nature**, v. 458, n. 7239, p. 725–731, 9 abr. 2009.

KEMI, O. J. et al. Exercise-induced changes in calcium handling in left ventricular cardiomyocytes. **Frontiers in Bioscience**, n. 13, p. 356–368, 2008.

KESSON, E. M. et al. Effects of multidisciplinary team working on breast cancer survival: Retrospective, comparative, interventional cohort study of 13 722 women. **BMJ**, v. 344, n. 7856, 2012.

KOELWYN, G. J. et al. Running on Empty : Cardiovascular Reserve Capacity and Late Effects of Therapy in Cancer Survivorship. **Journal of Clinical Oncology**, v. 30, n. 36, p. 4458–4461, 2012.

KOSSMAN, D. A. et al. Exercise lowers estrogen and progesterone levels in premenopausal women at high risk of breast cancer. **Journal of Applied Physiology**, v. 111, p. 1687–1693, 2011.

KRAMER, H. F.; GOODYEAR, L. J. Exercise and Inflammation Exercise , MAPK , and NF- κ B signaling in skeletal muscle. **Journal of Applied Physiology**, v. 103, n. 29, p. 388–395, 2007.

LAKOSKI, S. G. et al. The Influence of Adjuvant Therapy on Cardiorespiratory Fitness in Early-Stage Breast Cancer Seven Years After Diagnosis: The Cooper Center Longitudinal Study. **Breast Cancer Res Treat.**, v. 138, n. 3, p. 909–916, 2014.

LIN, E. Y. et al. Progression to malignancy in the polyoma middle T oncoprotein mouse breast cancer model provides a reliable model for human diseases. **The American journal of pathology**, v. 163, n. 5, p. 2113–26, 2003.

- LIU, Y. et al. Does Physical Activity Reduce the Risk of Prostate Cancer? A Systematic Review and Meta-analysis. **European Urology**, v. 60, p. 1029–1044, 2011.
- LOPE, V. et al. Gynecologic Oncology Physical activity and breast cancer risk by pathological subtype. **Elsevier**, 2016.
- LYNCH, B. M.; NEILSON, H. K.; FRIEDENREICH, C. M. Physical Activity and Breast Cancer Prevention. **Physical Activity and Cancer**, 2011.
- MALTA, D. C. et al. Probabilidade de morte prematura por doenças crônicas não transmissíveis, Brasil e regiões, projeções para 2025. **Revista brasileira de epidemiologia**, v. 22, 2019.
- MCCULLOUGH, L. E. et al. Fat or Fit: The Joint Effects of PA, Weight Gain, and Body Size on Breast Cancer Risk. **National Institutes of Health**, v. 118, n. 19, p. 4860–4868, 2013.
- MOORE, R. L. et al. Chronic exercise alters contractility of isolated rat cardiac myocytes and morphology. **American Journal of Physiology -Cell Physiology**, 1993.
- MORRIS, D. H. et al. Determinants of age at menarche in the UK: analyses from the Breakthrough Generations Study. **British Journal of Cancer**, v. 103, p. 1760–1764, 2010.
- MOSLEHI, J. J. Cardiovascular Toxic Effects of Targeted Cancer Therapies. **The new engl and journal of medicine**, v. 375, p. 1457–67, 2016.
- MU, J. et al. Respiratory mucosal immunization with adenovirus gene transfer vector induces helper CD4 T cell-independent protective immunity. **The journal of gene medicine**, v. 12, p. 693–704, 2010.
- MYERS, J. Exercise and Cardiovascular Health Jonathan Myers. **Circulation**, v. 107, n. 1, p. e2–e5, 2003.
- NAHUM, J. et al. Impact of longitudinal myocardial deformation on the prognosis of chronic heart failure patients. **Circulation: Cardiovascular Imaging**, v. 3, n. 3, p. 249–256, 2010.
- NEGISHI, K. et al. Independent and incremental value of deformation indices for prediction of trastuzumab-induced cardiotoxicity. **Journal of the American Society of Echocardiography**, v. 26, n. 5, p. 493–498, 2013.
- NYSTORIAK, M. A.; BHATNAGAR, A. Cardiovascular Effects and Benefits of Exercise. **Frontiers in Cardiovascular Medicine**, v. 5, n. 135, p. 1–11, 2018.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Folha informativa - Câncer**. Disponível em: <[https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5588:folha-informativa-cancer&Itemid=1094#targetText=O câncer é a segunda,de baixa e média renda](https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5588:folha-informativa-cancer&Itemid=1094#targetText=O%20c%C3%A2ncer%20%C3%A9%20a%20segunda,de%20baixa%20e%20m%C3%A9dia%20renda)>. Acesso em: 24 jul. 2019.
- PARK, M. K.; LEE, C. H.; LEE, H. Mouse models of breast cancer in preclinical research. **Laboratory Animal Research**, v. 34, n. 4, p. 160–165, 2018.
- PARKINS, K. M. et al. Multimodality cellular and molecular imaging of concomitant tumour enhancement in a syngeneic mouse model of breast cancer metastasis. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–10, 2018.

PAULINO, E. C. et al. Exercise Training and Caloric Restriction Prevent Reduction in Cardiac Ca^{2+} -Handling Protein Profile in Obese Rats. **Hypertension**, v. 56, n. 4, p. 629–635, 2010.

PEDERSEN, B. K. Anti-inflammatory effects of exercise: role in diabetes and cardiovascular disease. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 47, n. 8, p. 1–12, 2017.

PEDERSEN, B. K.; FEBBRAIO, M. A. Muscle as an endocrine organ: Focus on muscle-derived interleukin-6. **Physiological Reviews**, v. 88, n. 4, p. 1379–1406, out. 2008.

PEDERSEN, B. K.; FEBBRAIO, M. A. Muscles, exercise and obesity: Skeletal muscle as a secretory organ. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 8, n. 8, p. 457–465, 2012.

PEDERSEN, L. et al. Voluntary Running Suppresses Tumor Growth through Epinephrine- and IL-6-Dependent NK Cell Mobilization and Redistribution. **Cell Metabolism**, v. 23, p. 554–562, 2016.

PEEL, A. B. et al. Cardiorespiratory fitness in breast cancer patients: a call for normative values. **Journal of the American Heart Association**, v. 3, n. 1, p. 1–9, 2014.

PERETTO, G. et al. Cardiotoxicity in oncology and coronary microcirculation: Future challenges in theranostics. **Frontiers in Bioscience - Landmark**, v. 22, n. 10, p. 1760–1773, 2017.

PÉREZ-SALVIA, M. et al. Bromodomain inhibition shows antitumoral activity in mice and human luminal breast cancer. **Oncotarget**, v. 8, n. 31, p. 51621–51629, 2017.

PIGUET, A. C. et al. Regular exercise decreases liver tumors development in hepatocyte-specific PTEN-deficient mice independently of steatosis. **Journal of Hepatology**, v. 62, n. 6, p. 1296–1303, 1 jun. 2015.

PILEGAARD, H.; SALTIN, B.; NEUFER, P. D. Exercise induces transient transcriptional activation of the PGC-1 α gene in human skeletal muscle. **Journal of Physiology**, v. 546, n. 3, p. 851–858, 2003.

ROBSAHM, T. E. et al. Body mass index, physical activity, and colorectal cancer by anatomical subsites: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. **European Journal of Cancer Prevention**, n. 22, p. 492–505, 2013.

ROGERS, L. Q. et al. Effects of a physical activity behavior change intervention on inflammation and related health outcomes in breast cancer survivors: Pilot randomized trial. **Integrative Cancer Therapies**, v. 12, n. 4, p. 323–335, 2012.

ROLIM, N. P. L. et al. Exercise training improves the net balance of cardiac Ca^{2+} handling protein expression in heart failure. **Physiological Genomics**, v. 29, n. 3, p. 246–252, 2007.

ROSSI, F. et al. Evaluation of body Computed Tomography-determined sarcopenia in breast cancer patients and clinical outcomes: A systematic review. **Cancer Treatment and Research Communications**, v. 21, p. 1–7, 2019.

RUIZ-CASADO, A. et al. Exercise and the Hallmarks of Cancer. **Trends in Cancer**, v. 3, n. 6, p. 423–441, 2017.

- SAITO, R. DE F. et al. **Fundamentos de Oncologia Molecular**. 1^a ed. [s.l: s.n.].
- SALEMI, V. M. C. et al. Reference values from M-mode and Doppler echocardiography for normal Syrian hamsters. **European Journal of Echocardiography**, v. 6, n. 1, p. 41–46, 2005.
- SALMINEN, A.; HYTTINEN, J. M. T.; KAARNIRANTA, K. AMP-activated protein kinase inhibits NF- κ B signaling and inflammation: impact on healthspan and lifespan. **J Mol Med**, n. 89, p. 667–676, 2011.
- SASAKI, T. et al. Molecular regulation of Ca²⁺ pump ATPase by phospholamban in cardiac sarcoplasmic reticulum. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 3, p. 1674–9, 1992.
- SCHMITZ, K. H. et al. American college of sports medicine roundtable on exercise guidelines for cancer survivors. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 42, n. 7, p. 1409–1426, 2010.
- SCOTT, J. M. et al. The Potential Role of Aerobic Exercise to Modulate Cardiotoxicity of Molecularly Targeted Cancer Therapeutics. **The Oncologist**, v. 18, n. 2, p. 221–231, fev. 2013.
- SCOTT, J. M. et al. Cardiovascular Late Effects and Exercise Treatment in Breast Cancer: Current Evidence and Future Directions. **Canadian Journal of Cardiology**, v. 32, n. 7, p. 881–890, 1 jul. 2016.
- SHANNON, A. M. et al. Tumour hypoxia, chemotherapeutic resistance and hypoxia-related therapies. **Cancer Treatment Reviews**, v. 29, n. 4, p. 297–307, 2003.
- SPRINGER, J. et al. Prevention of liver cancer cachexia-induced cardiac wasting and heart failure. **European Heart Journal**, v. 35, n. 14, p. 932–941, 2014.
- STANDARD, J. et al. Reduced signaling of PI3K-Akt and RAS-MAPK pathways are the key targets for weight loss-induced cancer prevention by dietary calorie restriction and/or physical activity. **J Nutr Biochem**, v. 25, n. 12, p. 1317–1323, 2014.
- STEINBERG, G. R.; CARLING, D. AMP-activated protein kinase: the current landscape for drug development. **Nature Reviews Drug Discovery**, 2019.
- STOUT, N. L. et al. A Systematic Review of Exercise Systematic Reviews in the Cancer Literature (2005-2017). **PM&R**, v. 9, n. 9, p. 347–384, 2017.
- USHER, K. C. et al. A Very Short Hydrogen Bond Provides Only Moderate Stabilization of an Enzyme-Inhibitor Complex of Citrate Synthase. **Biochemistry**, v. 33, n. 25, p. 7753–7759, 1994.
- WAKS, A. G.; WINER, E. P. Breast Cancer Treatment: A Review. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, v. 321, n. 3, p. 288–300, 2019.
- WANG, R. et al. Pharmacological Dual Inhibition of Tumor and Tumor-Induced Functional Limitations in a Transgenic Model of Breast Cancer. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 16, n. 12, p. 2747–2759, 2017.
- WIDRICK, J. J. et al. Functional properties of human muscle fibers after short-term

resistance exercise training. **American Journal of Physiology**, v. 283, p. 408–416, 2002.

WOLFF, G. et al. Exercise maintains blood-brain barrier integrity during early stages of brain metastasis formation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 463, n. 4, p. 811–817, 13 jul. 2015.

XIE, Y. et al. Breast Cancer Survivorship and Cardiovascular Disease: Emerging Approaches in Cardio-Oncology. **Current Treatment Options in Cardiovascular Medicine**, v. 17, n. 12, p. 1–16, 2015.

ZANETTI, M.; CASTIGLIONI, P.; INGULLI, E. Principles of memory CD8 T-cells generation in relation to protective immunity. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 684, p. 108–125, 2010.

ZHANG, Q. B. et al. Moderate swimming suppressed the growth and metastasis of the transplanted liver cancer in mice model: With reference to nervous system. **Oncogene**, v. 35, n. 31, p. 4122–4131, 2015.

ZHONG, S.; CHEN, L.; LV, M. Nonoccupational physical activity and risk of ovarian cancer : a meta-analysis. **Tumor Biology**, v. 35, p. 11065–11073, 2014.

ZHU, Z. et al. Effect of nonmotorized wheel running on mammary carcinogenesis: Circulating biomarkers, cellular processes, and molecular mechanisms in rats. **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**, v. 17, n. 8, p. 1920–1929, ago. 2008.

ZIELINSKI, M. R. et al. Exercise delays allogeneic tumor growth and reduces intratumoral inflammation and vascularization. **Journal of Applied Physiology**, v. 96, n. 6, p. 2249–2256, jun. 2004.

APÊNDICE A – Súmula Curricular

Nome: Tássia Santos Rodrigues da Costa

1) Formação

Ano	Título ou atividade	Instituição
2005-2009	Graduação em Licenciatura plena em Educação Física	Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)
2010-2011	Especialização (Latu Sensu) em Treinamento de Força	Universidade Gama Filho (UGF)
2012-2014	Mestrado em Fisiologia Humana (Cardiovascular)	Universidade de São Paulo (USP)

2) Histórico profissional. Listar as principais posições profissionais que ocupou informando datas de início, término e instituições.

Ano	Título ou atividade	Instituição
2011-2012	Estágio em pesquisa	Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Fisiologia Cardiovascular (USP)
2012-2014	Aluna de Mestrado	Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Fisiologia Cardiovascular (USP)
2015-2019	Aluna de Doutorado	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP)

3) Lista de até 10 resultados de pesquisa mais relevantes, podendo ser artigos científicos, capítulos de livros, patentes (solicitadas ou concedidas), softwares registrados ou outros tipos de publicações que considere estarem entre as 10 mais relevantes de sua carreira.

Masson, G. S.; **Costa, T. S.**; Yshii, L.; Fernandes, D. C.; Soares, P. P.; Laurindo, F. R.; Scavone, C.; Michelini, L. C. Time-dependent effects of training on cardiovascular control in spontaneously hypertensive rats: role for brain oxidative stress and inflammation and baroreflex sensitivity. *PLoS One*. 2014 May 1;9(5):e94927.

Passos, C.S.; Sady, E.R.; Neves, R.V., Carvalho, B.E.; **Costa, T.S.**; Haro, A.S.; Silva, A.G.; Costa, F; Rosa, T.S.; Oliveira, A.S. Cancer and radiotherapy-related fatigue: implications and therapies integratives. *J Med Oncol Ther*. 2018;3(1):9-14.

4) Lista de financiamentos à pesquisa vigentes. NADA A DECLARAR

5) Lista de orientações em andamento, com bolsas. NADA A DECLARAR

6) Indicadores quantitativos. NADA A DECLARAR

7) Link para a página MyResearcherID (ISI) ou MyCitations (Google Scholar). NADA A DECLARAR

8) Outras informações. NADA A DECLARAR

APÊNDICE B – Manuscrito

Breast cancer promotes cardiac dysfunction that is reversible with exercise training in mice with metastatic breast cancer

Brief title: Exercise Prevents Cardiac Alterations

^{a,c}Tassia S. R. Costa, Ms; ^{a,c}Ursula Urias, PhD; ^dMarcelo V. Negrao, MD; ^aCamila P. Jordão, Ms;
^aClévia S. Passos, PhD; ^aVera Maria C. Salemi, MD, PhD; ^eAnnamaria A. Camargo, PhD;
^cPatricia C. Brum, PhD; ^cEdilamar M. Oliveira, PhD; ^{a,b}Ludhmila A. Hajjar, MD, PhD; ^bRoger
Chammas, MD PhD; ^aRoberto K. Filho, MD, PhD; ^{a,c}Carlos E. Negrao, PhD

^aHeart Institute (InCor) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Brasil; ^bCancer Institute of the State of São Paulo do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Brasil; ^cSchool of Physical Education and Sport da Universidade de São Paulo, Brasil; ^dDepartment of Thoracic/Head and Neck Medical Oncology, The University of Texas, MD Anderson Cancer Center, Houston, TX, USA, ^eCentro de Oncologia Molecular, Hospital Sírio-Libanês.

Total word count: 7051

Corresponding author:

Carlos Eduardo Negrao, PhD
Heart Institute (InCor), University of Sao Paulo Medical School
Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 44 – Cerqueira César – São Paulo – SP CEP
05403-904- Brazil.
Phone: (5511) 2661-5699 FAX: (5511) 2661-5043
E-mail: cndnegrao@incor.usp.br

ABSTRACT

Background: Patients treated for breast cancer have a high incidence of cardiovascular complications. There is a paucity of data analyzing the effect of exercise in preventing myocardial dysfunction in experimental and in clinical settings of breast cancer. We first evaluated the impact of breast cancer on cardiac function. Then, we investigated whether exercise training (ET) would prevent possible alterations in cardiac function.

Methods: A transgenic mouse model of spontaneous breast cancer (MMTV-PyMT) and littermate mice with no PyMT were involved in the cardiac function part of the study. In the exercise training part, MMTV-PyMT+ mice were divided into sedentary control and exercise-trained groups. Cardiac function was evaluated by high-resolution echocardiography with speckle-tracking imaging (STI) of longitudinal, radial, and circumferential strain and strain rate indices. Exercise tolerance test (ETT) was conducted on a motor treadmill and the maximal distance, maximal velocity and duration of the exercise were recorded. Echocardiography and ETT were performed at tumor appearance and at growth of 1cm³. ET was conducted on treadmill 5 days/wk at 50-60% maximal capacity for 60 minutes during the period of tumor growth. After euthanasia, Ca²⁺ handling protein expression was assessed by Western blot.

Results: Exercise capacity was reduced in MMTV-PyMT+ mice. Left ventricular longitudinal strain (p=0.002) and strain rate (p=0.05) were impaired in the MMTV-PyMT+ mice when compared to MMTV-PyMT- mice. Furthermore, cardiomyocyte total phospholamban expression was increased (p<0.0001) and SERCA2a/phospholamban ratio was reduced in the MMTV-PyMT+ mice (p=0.009). There was an inverse correlation between longitudinal strain and phospholamban protein in MMTV-PyMT+ mice (r=-0.6; p=0.01). ET significantly improved strain rate (p-interaction=0.05) and longitudinal strain (p-interaction=0.07). ET decreased phospholamban expression (p<0.0001), and increased SERCA2a (p<0.0001), NCX (p=0.04) and p-phospholamban expression (p=0.0001).

Conclusion: Breast cancer causes subclinical left ventricular dysfunction in MMTV-PyMT+ mice, which is associated with dysregulation of myocyte calcium handling. ET prevents this deleterious effect at least in part due to an improvement in intracellular Ca²⁺ handling.