LARISSA GONÇALVES FERNANDES

**Efeitos do treinamento físico aeróbio no músculo cardíaco na caquexia
induzida pelo câncer**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Fisiopatologia Experimental
Orientadora: Profa. Dra. Patricia Chakur Brum

São Paulo

2020

LARISSA GONÇALVES FERNANDES

**Efeitos do treinamento físico aeróbio no músculo cardíaco na caquexia
induzida pelo câncer**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Fisiopatologia Experimental
Orientadora: Profa. Dra. Patricia Chakur Brum

São Paulo

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Fernandes, Larissa Gonçalves

Efeitos do treinamento físico aeróbio no músculo cardíaco na caquexia induzida pelo câncer / Larissa Gonçalves Fernandes. -- São Paulo, 2020.

Dissertação (mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Fisiopatologia Experimental.

Orientadora: Patrícia Chakur Brum.

Descritores: 1.Treino aeróbico 2.Caquexia
3.Neoplasias 4.Coração 5.Fibrose 6.Proteínas
mitocondriais 7.Inflamação

USP/FM/DBD-011/20

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedico essa conquista a todos que passaram em minha vida. Um agradecimento especial aos meus pais, Nelson e Maria Aparecida, por todo suporte, amor, coragem, exemplos de alicerce. Ao meu irmão, Nelson Henrique, pela presença nos momentos importantes.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente e com todo meu amor, à minha família pela compreensão, suporte e paciência ao longo desses dez anos em São Paulo. À minha madrinha, Lourdes, minha segunda mãe, ao meu querido companheiro e amado Eduardo e sua família por todo carinho, apoio e todos os momentos de felicidade.

Aos amigos e integrantes do laboratório de fisiologia e bioquímica: João, Noemy, Will, Marcelo, Vanessa, Thiago, Raphael, Camila, Janaína, Ney, Sarah, Bozi, Rodrigo, Gabriel, Aline, por todo auxílio e por fazerem a alegria na hora do café e no dia a dia.

À minha orientadora Patricia Brum por todas oportunidades, inclusive a de ser integrante do Laboratório de Fisiologia Celular e Molecular do Exercício. Pelos exemplos de ciência e didática no ensino os quais colaboraram para o meu crescimento pessoal e profissional.

Ao Paulo Magno pela prontidão em realizar os exames ecocardiográficos, por todas as conversas políticas e por me apresentar uma sublime honestidade e humildade.

À Faculdade de Medicina e Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

À FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela concessão da bolsa de mestrado (processo 2016/22835-5) e pelo apoio financeiro para realização dessa pesquisa.

“A sua escolha inicial [do peixe-espada] fora se esconder nas águas escuras e profundas, para além de todos os laços, armadilhas e traições. A minha escolha fora procurá-lo onde jamais alguém ousara ir. Sim, onde jamais alguém ousara ir. E agora estavam ligados um ao outro e assim se encontravam desde o meio-dia. E não havia ninguém para ajudar nem a um nem a outro.” (p. 44).

O Velho e o Mar. Ernest Hemingway

Esta dissertação ou tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Abstract

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1	Câncer.....	21
2.2	Caquexia induzida pelo câncer	25
2.3	Disfunção cardíaca na caquexia do câncer.....	29
2.4	Adaptações cardíacas ao exercício físico	34
2.5	Exercício físico e caquexia induzida pelo câncer	36
3	JUSTIFICATIVA	40
4	OBJETIVOS	41
4.1	Objetivo geral	41
4.2	Objetivos específicos	41
4.2.1	Caracterizar o modelo CT26 de caquexia do câncer em camundongos BALB/c e os parâmetros funcionais e morfológicos cardíacos após inoculação de células do adenocarcinoma de cólon (CT26).....	41
4.2.2	Avaliar o efeito do treinamento físico aeróbio (TFA) na estrutura e função do músculo cardíaco de camundongos saudáveis e com inóculo das células do adenocarcinoma de cólon CT26.....	41
4.2.3	Avaliar mecanismos celulares e moleculares associados às alterações cardíacas encontradas em camundongos inoculados com células CT26 e o efeito do TFA.	41
5	MÉTODOS.....	41
5.1	Aprovação no Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA).....	41
5.2	Amostra e desenho experimental.....	42
5.3	Protocolo de treinamento físico aeróbio	43
5.4	Teste incremental máximo em esteira rolante.....	43
5.5	Células CT26: Cultura celular e Inóculo	44
5.6	Medidas ecocardiográficas.....	44

5.7	Análise morfológica cardíaca	45
5.8	Avaliação da área de infiltração por células hematopoiéticas	46
5.9	Crescimento tumoral e massa corporal	46
5.10	Método de eutanásia	47
5.11	Expressão gênica	47
5.12	Expressão Proteica	48
5.13	Função Mitocondrial	49
5.13.1	Isolamento das mitocôndrias	49
5.13.2	Consumo de oxigênio na mitocôndria isolada	49
5.14	Análise estatística	50
6	RESULTADOS	51
6.1	Caracterização do modelo experimental de caquexia do câncer CT26	51
6.2	Efeito do treinamento físico aeróbio sobre a estrutura e função do músculo cardíaco no modelo experimental de caquexia do câncer CT26	59
6.3	Efeito do treinamento físico aeróbio nas alterações proteicas e gênicas do músculo cardíaco de camundongos do modelo CT26.	72
7	DISCUSSÃO	79
8	CONCLUSÃO	88
9	ANEXOS	89
9.1	ANEXO A -Submissão de artigo original	89
9.2	ANEXO B - Colaborações: artigo original submetido e em preparação	91
9.2.1	Submetido	91
9.2.2	Preparação	92
10	ANEXO C - Colaboração em capítulo de livro: CARDIOLOGIA DO EXERCÍCIO - DO ATLETA AO CARDIOPATA. 4ª EDIÇÃO.	93
11	ANEXO D - Congressos	94
12	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95
13	APÊNDICE	103
13.1	Dados individuais da subseção: “Caracterização do modelo de adenocarcinoma de cólon CT26.” (pg., 53)	103
13.2	Dados individuais da subseção: Efeito do treinamento físico aeróbio sobre a função e estrutura cardíacas no modelo experimental de caquexia do câncer do adenocarcinoma de cólon (CT26).	109

LISTA DE ABREVIATURAS

AET	Aerobic Exercise Training
TFA	Treinamento Físico Aeróbio
Akt	Protein Kinase B
ANP	Atrial Natriuretic Peptide
ATP	Trifosfato de Adenosina
ATP5A	ATP Synthase Subunit 5 Alpha
BNP	Brain Natriuretic Peptide
CT26	Células do Adenocarcinoma 26
DVED	Diâmetro do Ventrículo Esquerdo na Diástole
DVES	Diâmetro do Ventrículo Esquerdo na Sístole
GAPDH	Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase
IL5	Interleukin 5
MTCOI	Mitochondrial Cytochrome Oxidase I
mTOR	Mammalian Target Of Rapamycin
NDUFB8	Dehydrogenase [Ubiquinone] 1 Beta Subcomplex Subunit 8
DPVED	Diâmetro da Parede Posterior do Ventrículo Esquerdo na Diástole
DPVES	Diâmetro da Parede Posterior do Ventrículo Esquerdo na Sístole
SDHA	Succinate Dehydrogenase A
SDHB	Succinate Dehydrogenase B
SED	Camundongo Sedentário
SIVD	Septo Interventricular na Diástole
SIVS	Septo Interventricular na Sístole
SMAD	Mother Against <i>Decapentaplegic</i> (<i>Drosophila</i>); "Small" Worm Phenotype (<i>C. Elegans</i>)
TGF-β	Transforming Growth Factor Beta
TR	Camundongo Treinado
ActRIIB	Activin Receptor Type IIB
GDF11	Growth Differentiation Factor 11
IL-6	Interleukin 6
Fstl1	Follistatin-Like 1
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
IL-8	Interleukin 8
PIF	Proteolysis- Inducing Factor
IGF	Insulin-Like Growth Factor 1
PI3K	Phosphoinositide 3-Kinase

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fatores que influenciam a progressão tumoral. (Hanahan e Weinberg, 2000, página 58)	23
Figura 2. Indicativos clínicos de progressão da caquexia do câncer segundo consenso publicado no Lancet Oncol (Fearon et al., 2011).	26
Figura 3. Desenho experimental do modelo de caquexia CT26.	42
Figura 4. Desenho experimental do modelo de caquexia do câncer CT26 sem intervenção do TFA.	51
Figura 5. Inóculo subcutâneo de células do adenocarcinoma de cólon (CT26) induzem caquexia.	54
Figura 6. Caquexia do câncer induz alteração de diferentes tecidos de camundongos inoculados com células tumorais do carcinoma de cólon (CT26	55
Figura 7. Caquexia do câncer promove remodelamento do músculo cardíaco	57
Figura 8. Caquexia do câncer no modelo CT26 diminui a função cardíaca... ..	57
Figura 9. Desenho experimental do modelo do adenocarcinoma de cólon (CT26).	59
Figura 10. Capacidade aeróbia de camundongos saudáveis após o período do protocolo de TFA.	60
Figura 11. Efeito do treinamento físico aeróbio na massa corporal, musculatura esquelética e volume tumoral de camundongos saudáveis e inoculados com CT26 sedentários e treinados.	62
Figura 12. Efeito do treinamento físico aeróbio na massa cardíaca e diâmetro de cardiomiócitos.	65
Figura 13. Efeito do TFA no conteúdo intersticial de colágeno cardíaco.	69
Figura 14. TFA reduz a inflamação cardíaca na caquexia do câncer.	71
Figura 15. Níveis de expressão de mRNA de genes relacionados ao remodelamento cardíaco e inflamação em camundongos CT26 com tumor.	74
Figura 16. Alteração do conteúdo proteico de complexos mitocondriais do músculo cardíaco de camundongos do modelo CT26.	75
Figura 17. Respiração mitocondrial da fração cardíaca do modelo CT26.	77
Figura 18. Resumo gráfico dos resultados do estudo.	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros ecocardiográficos do modelo experimental CT26 (pg. 58).

Tabela 2. Massa de diferentes órgãos alterados em decorrência da caquexia do câncer (pg. 64).

Tabela 3. Parâmetros ecocardiográficos do modelo experimental CT26: efeitos do TFA (pg. 67).

RESUMO

Fernandes LG. *Efeitos do treinamento físico aeróbio no músculo cardíaco na caquexia induzida pelo câncer* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2020.

A disfunção cardíaca induzida pela caquexia do câncer tem assumido papel relevante no gerenciamento da sobrevida e qualidade de vida de pacientes com câncer. Há décadas, o treinamento físico aeróbio (TFA) tem sido preconizado como terapia adjuvante em diversas doenças cardiovasculares, e propô-lo como intervenção terapêutica ou preventiva nas alterações cardíacas causadas pelo câncer deve ser considerado. Na presente dissertação, investigamos o impacto da caquexia do câncer e do TFA na função e estruturas cardíacas usando o modelo de adenocarcinoma 26 (CT26) em camundongos BALB/c. O TFA foi realizado durante 45 dias, 60 minutos por sessão a 60% da velocidade máxima e 5 dias por semana. A função cardíaca foi avaliada por exame ecocardiográfico bidimensional em modo M e a estrutura cardíaca foi avaliada por microscopia óptica. As expressões de proteínas do complexo mitocondrial (complexo mitocondrial I, II, IV e V) foram analisados por *Western blotting*. Os níveis de RNAm de TGF- β 1, Smad2/3, ANP, BNP e SDHA foram analisados por PCR quantitativo em tempo real. Nossos dados sugerem o modelo CT26 como robusto e representativo da caquexia do câncer de cólon caracterizado pela perda de massa corporal, atrofia muscular esquelética e perda de tecido adiposo nos animais com tumor CT26. Além disso, esses animais também apresentam atrofia, disfunção e remodelamento cardíaco caracterizados pela redução da massa cardíaca e diâmetro dos miócitos cardíacos, redução da fração de ejeção do ventrículo esquerdo, inflamação e fibrose no tecido cardíaco. Associado ao remodelamento cardíaco, observamos níveis de mRNA aumentados para TGF- β 1 e reduzidos de Smad2 nos animais com tumor, além de um desbalanço energético observado pela redução dos níveis proteicos do complexo mitocondrial IV e níveis de mRNA de SDHA. Por sua vez, o TFA foi eficaz em atenuar a redução do conteúdo proteico do

complexo IV nos animais com tumor e restabelecer os níveis proteicos do complexo II aos do grupo controle, mas não teve impacto na fração de ejeção do ventrículo esquerdo e atrofia cardíaca. Portanto, o TFA foi eficaz em promover o anti-remodelamento cardíaco patológico por redução da fibrose e inflamação no coração dos animais com tumor, associado à redução de TGF- β 1 e melhora do metabolismo oxidativo no coração dos animais com tumor. Em conjunto, essas alterações promovidas pelo TFA fornecem evidências que auxiliam a combater as condições caquéticas que afetam gravemente o músculo cardíaco.

Descritores: Treino aeróbico; Caquexia; Neoplasias; Coração; Fibrose, Proteínas Mitocondriais; Inflamação.

ABSTRACT

Fernandes LG. *Effects of aerobic exercise training on cardiac muscle in cancer-induced cachexia* [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2020.

Cancer cachexia-induced cardiac damage has become an important issue to survival management and quality of life in cancer patients. Since aerobic exercise training (AET) has been shown to reduce the negative effects of heart failure and other comorbidities, its use as preventive or therapeutic tool has considered a reasonable intervention for cancer-induced cardiac dysfunction. In this master dissertation, we aimed to investigate the impact of cancer cachexia and previous AET on cardiac function and structure using a colon adenocarcinoma cells 26 (CT26). AET consisted of 45 days, 60 minutes/session at 60% of maximal speed, and 5 days per week. Cardiac function was assessed by two-dimensional guided M-Mode echocardiography and cardiac structure was evaluated by light microscopy. The protein expression levels of mitochondrial complex (I, II, IV and V) were analyzed by western blotting. The mRNA levels of TGF- β 1 and Smad-2/3 were analyzed by quantitative Real-Time PCR. Our data confirm CT26 tumor-bearing mice as a well-characterized model of cancer cachexia with body-weight loss, skeletal muscle atrophy, splenomegaly and pulmonary edema. CT26 bearing mice exhibited cardiac atrophy, cardiac dysfunction and remodeling characterized by impaired left ventricle ejection fraction associated with increased cardiac collagen deposition and reduced cardiac myocyte's diameter. Indeed, CT26 tumor-bearing mice showed reduced complex IV mitochondrial proteins levels, increased TGF- β 1, SDHA and reduced Smad2 mRNA levels. AET was efficient in attenuating the reduced complex IV and re-establishes complex II toward control levels with no impact on left ventricle ejection fraction and cardiac atrophy. Interestingly, AET led to significant anti-cardiac remodeling effect by reducing cardiac collagen deposition and inflammation associated to reduced levels of TGF- β 1 and oxidative metabolism improvement. Taken together, our

study provides evidence for cardiac dysfunction and remodeling in CT26 model. The effects of AET in attenuating cardiac fibrosis and inflammation provide mechanistic insights by which AET can help counteracting cachectic conditions that severely affects cardiac muscle.

Descriptors: Endurance training; Cachexia; Neoplasms; Heart; Fibrosis; Mitochondrial proteins; Inflammation.

1 INTRODUÇÃO

No mundo, foi estimado mais de 17 milhões de novos casos de câncer em 2018. Em 2040 é esperado um crescimento de 27,5 milhões de novos casos e 16,3 milhões de mortes causadas pelo câncer (American Cancer Association, 2018). Esses números revelam o crescente percentual da população que irá lidar com as ameaças do câncer. Associado ao câncer, também há o aumento da incidência de caquexia. A caquexia do câncer é uma síndrome multifatorial complexa caracterizada principalmente pela perda massiva de tecido adiposo e muscular esquelético, a qual não pode ser revertida por aporte nutricional convencional e que resulta na progressiva incapacidade funcional do paciente (Fearon et al., 2011). Acomete 50 a 80% dos pacientes oncológicos (Argiles et al., 2014) e está associada a mais de 20% das mortes no câncer (Argilés et al., 2014; Fearon et al., 2013; Tisdale, 2010).

Apesar dos avanços na compreensão dos aspectos moleculares e clínicos dessa síndrome, as causas exatas de morte, e principalmente, a contribuição da disfunção cardíaca à mortalidade nesses pacientes ainda é desconhecida (Springer et al., 2014). Enquanto a maioria dos estudos têm avaliado a perda substancial de músculo esquelético e possíveis mecanismos para atrofia desse tecido, alterações no músculo cardíaco promovidas pela ação tumoral, independentemente da quimioterapia e radioterapia, têm recebido relativamente pouca atenção. As alterações cardíacas parecem ser de grande importância no tratamento do câncer pois contribuem para fadiga, limitação ao esforço, redução da qualidade de vida e sobrevida do paciente (Blauwhoff-Buskermolen et al., 2017; Porporato, 2016).

O impacto da presença de caquexia na susceptibilidade às alterações estruturais cardíacas foi recentemente demonstrado por Schafer et al. (2016), que observou atrofia, disfunção cardíaca e metabólica restrita a modelos animais de caquexia do câncer, uma vez que na ausência de caquexia não foram observadas alterações cardíacas (Schafer et al. 2016). De fato, há evidências na literatura de disfunção metabólica e contrátil cardíaca associada

às alterações no perfil molecular de expressão de proteínas contráteis e *brain natriuretic peptide* (BNP), considerado marcador de reprogramação fetal cardíaca e remodelamento patológico (Baskin et al., 2011; Marin-Corral et al., 2010; Sjostrom et al., 1987; Drott et al., 1986; Tian et al., 2010, 2011 Springer et al., 2010). Interessante, Shum et al., (2015) observaram que os músculos cardíaco e esquelético possuem transcriptomas distintos em modelo de caquexia do câncer, e que as respostas moleculares são específicas para esses dois diferentes tipos de tecidos, sugerindo que estratégias terapêuticas não devem ter os mesmos efeitos nesses tecidos.

Embora existam na literatura, evidências e algumas possíveis explicações para o declínio da função cardíaca na caquexia do câncer e danos morfológicos presentes nesse tecido, ainda há uma grande lacuna de conhecimento a ser preenchida. De fato, ainda não se sabe se a atrofia ou disfunção cardíaca está presente em todos pacientes com caquexia do câncer. Ademais, intervenções que modulem o *turnover* proteico, como o exercício físico e agentes farmacológicos podem ser estudados como uma forma de atenuar a disfunção cardíaca e aumentar a longevidade nesses pacientes. Cabe ressaltar que alterações morfofuncionais cardíacas no câncer parecem contribuir para o agravamento da doença e a resposta ao tratamento, podendo influenciar diretamente a condição física e a qualidade de vida do paciente (Schunemann et al., 2008).

O treinamento físico aeróbio (TFA), estudado há mais de quatro décadas, é uma terapia adjuvante eficaz em doenças crônicas. Nas doenças cardiovasculares, o TFA é preconizado para a prevenção e o tratamento sendo recomendado pelas principais diretrizes de tratamento de doenças cardíacas (SBC 2012, ACC/AHA 2014). De fato, o TFA promove remodelamento cardíaco reverso com redução de fibrose e melhora na função contrátil (Oliveira et al., 2009, Naylor et al., 2008; Rolim et al., 2007). Ainda, o TFA leva a um aumento no consumo de oxigênio pelas células cardíacas que reflete a melhora no metabolismo energético (Kavazis et al., 2009; Alberto Boveris, 2008). Em relação ao efeito do TFA, muitos estudos têm demonstrado associação entre atividade física regular na diminuição da incidência de câncer e mortalidade. Estudo recente de Moore et.al (2016) demonstraram uma correlação negativa

entre os níveis de atividade física diária e incidência de 13 tipos de câncer, sugerindo que o nível de atividade física pode estar, de fato, associado ao menor risco de diferentes tipos de câncer primário, sendo, portanto, uma importante ferramenta no controle e na prevenção do câncer. A prática regular de exercício físico está associada ao menor risco de morte devido ao câncer, particularmente no câncer de mama e colorretal (Campbell et al., 2013; Schmid, D.&Leitzman. 2014). Há um crescente interesse de entender o efeito do exercício físico para além das evidências apresentadas nos estudos epidemiológicos. Atualmente, os pesquisadores buscam elucidar os mecanismos biológicos que explicam o potencial anticarcinogênico da prática regular de exercício físico. A compreensão de tais mecanismos pode ajudar no desenvolvimento de estratégias preventivas e tratamentos. No entanto, ainda há carência na literatura de trabalhos que forneçam suporte científico para melhor compreensão dos efeitos do TFA na caquexia do câncer, principalmente no que diz respeito ao músculo cardíaco.

Diante do exposto, nosso estudo pretendeu investigar o papel do TFA sobre o músculo cardíaco em modelo experimental de caquexia do câncer. Para isso, a hipótese inicial que orientou nosso estudo é de que o TFA atenuaria a disfunção e remodelamento cardíaco em modelo animal de caquexia do câncer.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Câncer

Em 1862, Edwin Smith relatou descrições de um manuscrito datado do século VII a.C. sobre uma doença misteriosa. O papiro traduzido em 1930 contém ensinamentos de Imhotep, médico egípcio que registrou o “caso 45” como:

Se você examina (um caso) de massas salientes no peito e descobre que elas se espalharam pelo peito; se põe a mão sobre (o) peito (e) acha (as massas) frias, sem aumento de temperatura, elas não têm granulações, não contêm líquido em seu interior, não apresentam perda de líquido, e ainda assim são salientes ao toque, você pode dizer: “ Este é um caso de massas salientes contra o qual tenho de lutar (...). (Imperador de todos os males, Siddhartha Mukherjee, 2012 página 61).

Desde então, o câncer se apresenta como uma doença misteriosa e complexa. O câncer é uma das principais causas de morte no mundo, há uma estimativa de 18,1 milhões de novos casos de câncer, e 9,6 milhões de mortes pelo câncer que ocorreram em 2018 no mundo (Ferlay, 2019). . Esse valor corresponde a 22% do total de mortes por doenças não infecciosas Além disso, mais de 60% do total de novos casos de câncer ocorrem na África, Ásia e América Central e do Sul, sendo essas regiões responsáveis por 70% das mortes por câncer no mundo ((WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO, 2016).

Segundo a definição do Instituto Nacional do Câncer câncer é o nome dado ao conjunto de doenças que envolvem o crescimento anormal de células com potencial de invasão e migração para outras regiões do corpo (cancer.gov, 2015). Quando células anormais não são eliminadas e substituídas, elas passam a se acumular e novas células são formadas quando não são

necessárias. Essas células extras podem proliferar sem limite e formar massas sólidas conhecidas como tumores.

As alterações celulares podem ser resultado de uma variedade de fatores, tanto intrínsecos, como mutações genéticas herdadas ou erros aleatórios na replicação do DNA, quanto extrínsecos, como por exemplo, dano e instabilidade genética induzida por infecção viral ou substâncias químicas (Onuchic e Chammas, 2010).

Na revisão de Hanahan e Weinberg (Hanahan e Weinberg, 2000) propuseram um modelo que evidencia seis alterações celulares fundamentais (*hallmarks*) para a transformação de uma célula normal em cancerígena: 1) sinais de proliferação próprios, 2) insensibilidade à sinais inibidores de crescimento, 3) evasão da apoptose, 4) potencial replicativo ilimitado, 5) angiogênese sustentada, e 6) invasão tecidual e metástase (Figura 1). Em 2011, houve a adição de quatro alterações também consideradas como fundamentais ao processo de carcinogênese. Dentre as novas alterações, chamados de “*hallmarks* emergentes” destacam-se: 7) a capacidade de reprogramação do metabolismo energético da células e 8) evasão ao sistema imune. As chamadas de “características favoráveis” são: 9) a instabilidade genômica, e 10) a inflamação promovida pelas células imunológicas no ambiente microtumoral (Figura 1). Atualmente, esses são considerados os 10 *hallmarks* do câncer.

Figura 1. Modelos relacionados ao processo de carcinogêneses propostos por Hanahan e Weinberg, 2000, 2011.

Brevemente, dentre os fatores que influenciam no crescimento e progressão tumoral, se evidencia a capacidade da célula tumoral de manter sinais de proliferação de forma crônica. No ciclo de crescimento e divisão de uma célula normal, a produção e a liberação de fatores de crescimento e proliferação são cuidadosamente controlados para assegurar a arquitetura e função do tecido. No entanto, as células cancerosas possuem esses sinais desregulados o que resulta em proliferação e crescimento desordenado sem a preservação do arranjo morfológico e funcional do tecido.

Para exemplificar, um dos fatores conhecidos que auxiliam as células normais a alterarem sua função e morfologia é desencadeado por sinalização da família do *transforming growth factor beta* (TGF- β). Diversas evidências sugerem importante papel da via na iniciação e progressão tumoral, incluindo proliferação celular, angiogênese, invasão, inflamação e indução da transição epitélio-mesênquima. No entanto, seu papel é complexo e envolve atividades anti- e pro-tumorais dependendo do contexto espaço/tempo e o microambiente tumoral (Liu et al., 2018).

A invasão e a metástase também são características destacadas pelos autores Hanahan e Weinberg, 2000, e constituem características importantes da célula tumoral associadas à alta letalidade no câncer. A metástase é caracterizada como uma formação e infiltração de células tumorais em outro

tecido e são originárias do tumor primário. É um processo complexo onde a célula tumoral se desprende do tumor primário e através da circulação linfática ou sanguínea pode se disseminar e alojar em locais distantes do tumor primário. Interessante, a via de TGF- β também está envolvida nessa importante característica da célula tumoral, por meio de sua mediação na transição epitélio-mesênquima necessária no processo metastático. Já foi demonstrado que altos níveis de TGF- β presente no microambiente tumoral de câncer de mama promove metástase pulmonar de células do câncer de mama (Padua et al., 2008).

A resistência à morte celular é outra característica notável da célula cancerosa. O conceito que a morte celular programada por apoptose serve como barreira natural para o desenvolvimento do câncer foi estudado nas últimas duas décadas. A célula cancerosa utiliza de várias adaptações e estratégias para driblar a programação e maquinaria de apoptose celular, assim promove o crescimento do tumor e resiste a outras ameaças como o tratamento antineoplásico (Hanahan and Weinberg, 2011).

As células cancerosas também podem contornar programas robustos que regulam negativamente a proliferação de células; muitos desses programas dependem das ações de genes supressores de tumores. Somada a essa característica, a célula cancerosa também apresenta a capacidade de evasão de sinais supressores de crescimento. Uma das proteínas mais conhecidas da classe de supressores tumorais é a P53 que controla a proliferação celular e pode apresentar prejuízos em sua regulação e expressão possibilitando o crescimento desenfreado. Essas células também possuem um potencial replicativo ilimitado e isso gera a possibilidade deformarem tumores sólidos macroscópicos (Hanahan and Weinberg, 2011).

Já a angiogênese é caracterizada pela formação de novos vasos a partir de vasos já existentes e somada ao desenvolvimento de uma neovasculatura constituem um processo fisiológico em tecidos. É um processo transiente que ocorre em resposta a estímulos como cicatrização e ciclo reprodutivo feminino,

no entanto, no tumor esse processo é sustentado e a formação de novos vasos contribui para o crescimento do tumor.

De forma geral, o câncer vem sendo percebido como um microambiente tumoral complexo onde interagem células com instabilidade genética, células normais (fibroblastos, células imunes, células endoteliais), vasos e fatores produzidos localmente ou provenientes da irrigação sanguínea (Hanahan e Weinberg, 2000). Portanto, descrevemos brevemente o tumor sólido como um tecido capaz de alterar a homeostasia e dinâmica do tecido original com o objetivo de sobreviver e crescer.

2.2 Caquexia induzida pelo câncer

No Brasil, o câncer figura entre um dos maiores problemas de saúde pública e sua taxa de mortalidade é alarmante (INCA, 2017). A caquexia do câncer é associada à grande parte das mortes na doença (Tisdale, 2010). Uma das características mais evidentes na síndrome é a grande perda de musculatura esquelética (com ou sem perda de massa gorda) e incapacidade funcional do paciente com câncer (Fearon et al., 2011). A síndrome apresenta três estágios de relevância clínica, a considerar no primeiro estágio (i.e pré-caquexia) uma grande perda de massa corporal (aproximadamente 5%), e no segundo estágio (i.e caquexia) uma perda de massa corporal acima de 2%, associada a um índice de massa corpórea (IMC) inferior a 20, ou perda de massa corporal acima de 2% associada a sarcopenia. No terceiro estágio (i.e caquexia refratária) a caquexia pode ser clinicamente refratária, como resultado de um câncer em estágio muito avançado (terminal), ou à progressão rápida do câncer não responsivo ao tratamento. Vale ressaltar que a expectativa de vida nesse estágio é inferior a três meses (Fearon et al., 2011). Apesar dos avanços no tratamento do câncer e compreensão dos aspectos moleculares e clínicos envolvidos na caquexia do câncer ainda não há tratamentos estabelecidos para essa síndrome, principalmente porque os mecanismos fisiopatológicos que

conduzem os pacientes à morte são desconhecidos. Portanto, a caquexia do câncer representa um importante problema clínico mundial.

Figura 2. Indicativos clínicos de progressão da caquexia do câncer segundo consenso publicado no Lancet Oncol. (Fearon et al., 2011).

A perda de massa corporal na caquexia do câncer é considerada como principal fator de progressão da doença e contribui para a intolerância aos esforços físicos do cotidiano e para a redução da qualidade de vida do paciente caquético (Acharyya et al., 2005; Van Eys, 1985). A anorexia está presente na caquexia do câncer em grande parte dos casos (Bosaeus, 2008), somado a um estado hipercatabólico/hipermetabólico característico da síndrome que causa desbalanço energético e proteico. Além da perda de massa envolvendo primariamente os tecidos muscular e adiposo, outros órgãos também são afetados, incluindo o fígado, rins, pulmão e baço (Fukuda et al., 2009). Recentemente, estudos têm revelado que a disfunção e atrofia cardíacas também ocorrem na caquexia do câncer (Xu et al; 2011 Cosper et al., 2011,

Kazemi-Bajestani., 2014, Springer et al., 2014, Tian et al., 2011), e parecem ser um fator adicional, contribuindo para o desenvolvimento da caquexia e exacerbando a perda de massa corporal no paciente com câncer (Schäfer et al., 2016). Fatores como alterações no sistema imune, inflamação sistêmica e elevada quantidade de citocinas inflamatórias, composição corporal (perda de massa muscular e adiposa) também contribuem para a redução na resposta ao tratamento (Tisdale, 2002). Em conjunto, esse quadro característico conduz ao mau prognóstico e agravamento da doença. No trabalho de Sun e colaboradores (2015) pacientes em estado avançado do câncer foram avaliados para diagnóstico de caquexia e tratamento. A maior prevalência de caquexia parece ser em pacientes com câncer pancreático ou gástrico, sendo que em pacientes com linfoma non-Hodgkin's, câncer de mama, leucemia aguda, e sarcomas apresentam a menor frequência de caquexia (Sun et al., 2015). Esses dados sugerem influência considerável da biologia tumoral específica e sua interação com o organismo de origem.

São diversos os mediadores envolvidos na hiperativação de sistemas proteolíticos ou na inibição de vias de síntese proteica, caracterizando o desbalanço entre síntese e degradação. (Fearon et al., 2012). Atualmente, os estudos buscam compreender os mecanismos e vias desencadeadores da síndrome, maneiras de identificação precoce do seu desenvolvimento, terapias alternativas e preventivas para atenuar o seu impacto na qualidade de vida e sobrevida do paciente com câncer. Contudo, essas vias e mecanismos foram bem investigados somente no tecido muscular esquelético, considerando que a musculatura esquelética é o maior tecido envolvido na caquexia do câncer, e representa até 40% da perda de massa corporal (Argilés 2003). Assim, no sentido de desenvolver estratégias terapêuticas para o tratamento da caquexia do câncer, muitos estudos investigaram vias que participam dos processos de crescimento celular. Uma das vias estudadas é a via *mammalian target of rapamycin* (mTOR) que parece ser alvo no tratamento da caquexia do câncer por ser uma via envolvida no processo catabólico presente na atrofia do músculo. White et al., 2011 revelaram que o músculo gastrocnêmio de animais *Apc^{Min/+}* em modelo de câncer colorretal apresentam uma diminuição

progressiva na atividade de mTORC desde o início da caquexia até a perda extrema de massa corporal, sugerindo que a redução da sinalização por mTOR no músculo esquelético contribui para perda de massa muscular na caquexia do câncer (White et al., 2011).

Já no músculo cardíaco, a sinalização envolvendo ativação por AMPK e a via PI3K/Akt/mTOR foi reportada por Manne et al., 2013. Nesse estudo, foi utilizado o mesmo modelo de câncer colorretal *Apc^{Min/+}* onde houve perda de massa cardíaca associada ao menor conteúdo proteico cardíaco por supressão da atividade de mTOR em resposta ao aumento da fosforilação de AMPK. Assim, os pesquisadores demonstraram que, similar ao músculo esquelético, a atrofia cardíaca no câncer está associada à fosforilação de Akt e mTOR. Akt é uma quinase serina/treonina envolvida na regulação da morte e metabolismo celular, assim sua ativação no coração atrofiado pode ser uma resposta compensatória para minimizar os efeitos apoptóticos e preservar a massa cardíaca. Além disso, mTOR também é requisitada para a sobrevivência celular e indução de síntese proteica. No entanto, em contraste aos níveis aumentados de Akt, esse estudo demonstrou um menor nível proteico de mTOR no coração na caquexia do câncer (Manne et al., 2013).

Nesse sentido, o papel da sinalização de PI3K/Akt/mTOR é um exemplo da importância em conhecer possíveis mecanismos que possam ser utilizados como intervenção terapêutica no contexto do câncer e da caquexia do câncer. No entanto, no contexto das alterações desencadeadas no tecido cardíaco há uma carência de estudos que explorem os mecanismos e a função de possíveis alvos.

2.3 Disfunção cardíaca na caquexia do câncer

As alterações cardíacas induzidas pela caquexia do câncer impactam na qualidade de vida e sobrevida do paciente com câncer (Schäfer et al., 2016, Schunemann et al., 2008; Argilés et al., 2014). Como visto anteriormente, a maioria dos estudos têm voltado sua atenção para a perda massiva de tecido adiposo e muscular esquelético na síndrome, no entanto, estudos que abordam a alteração na estrutura cardíaca e possíveis mecanismos ainda são elusivos. Já foi reportado que pacientes com câncer gastrointestinal, pancreático e câncer pulmonar de células não pequenas apresentaram massa cardíaca e espessura do ventrículo esquerdo reduzidos quando comparados a pacientes não caquéticos (Springer et al., 2013).

As evidências na literatura sugerem uma relação entre a presença de câncer e a miopatia cardíaca, independente dos tratamentos para o câncer. Além disso, não está claro se as alterações cardíacas na caquexia antecedem a atrofia do tecido muscular esquelético, assim como ocorre na insuficiência cardíaca. De fato, ainda que a massa muscular contribua por mais de 40% do peso corporal total, e que possa ser o principal tecido envolvido na perda de massa na caquexia, órgãos como tecido adiposo, cérebro, fígado e coração parecem estar diretamente envolvidos na síndrome e podem estar conectados à perda de massa muscular (Argilés et al., 2014). Já está descrita a relação entre tecido adiposo e muscular na caquexia, ou seja, a comunicação entre fatores liberados pelas células musculares ou células adiposas, descritos como miocinas e adipocinas, como a interleucina 5 (*interleukin 5*, IL-5) que participa da inter-comunicação entre o tecido adiposo e muscular (Argilés et al., 2018). Somado a esse sistema de comunicação entre tecidos, há também fatores derivados diretamente do tumor, como fator de indução de proteólise (*proteolysis-inducing factor*, PIF), o qual possui níveis plasmáticos elevados em modelos animais e em pacientes com caquexia do câncer. PIF é um fator liberado apenas pelo tumor e exerce ação na musculatura esquelética onde é capaz de induzir proteólise por atenuar a síntese proteica pela fosforilação do fator de iniciação eucariótica 2 α . Assim, antagonistas de PIF parecem ser

efetivos na prevenção da perda de massa muscular e também de tecido adiposo em pacientes com câncer, dessa forma, os autores sugerem uma relação entre a perda de massa muscular e adiposa (Bing et al., 2010; Tisdale, 2010). Nesse sentido, parece sugestivo que o tecido cardíaco também libere peptídeos que sejam capazes de interagir com o músculo esquelético e vice-versa, influenciando na progressão da síndrome. Entretanto, vale considerar que ainda não há descrito na literatura essa relação e mecanismos.

A causa de morte de pacientes com caquexia do câncer é primariamente devido ao tumor, mas muitos casos possuem um desfecho definido por arritmias cardíacas, hipoventilação, tromboembolia, falência renal, supressão imunológica, reforçando a natureza multifatorial dessa síndrome (Argilés et al., 2014). Em sobreviventes de câncer de mama foi observado que as causas de morte de origem cardiovascular se sobrepuseram ao câncer de mama como principal causa de morte após 9 anos do diagnóstico de câncer (Patnaik et al., 2011).

As alterações metabólicas e estruturais da musculatura esquelética parecem figurar como papel central na síndrome, sendo que fatores podem ser liberados do músculo esquelético e poderão interagir com o metabolismo de outros órgãos, como o coração. Portanto, parece razoável que tratamentos que modulem o metabolismo desses tecidos na caquexia sejam eficazes em melhorar o prognóstico do paciente com câncer.

A caquexia cardíaca decorrente da insuficiência cardíaca é diagnosticada quando a perda de massa corporal ultrapassa ou é igual a 5% (Christensen et al., 2013). Atualmente, diversos marcadores têm sido propostos para ajudar na identificação precoce de caquexia cardíaca, no entanto, devido à complexidade e etiologia multifatorial, os mecanismos fisiopatológicos ainda não foram estabelecidos. Portanto, fica evidente a dificuldade de se estabelecer terapias específicas para prevenção e tratamento da caquexia cardíaca. Quando a caquexia cardíaca tem como etiologia o câncer, o panorama se torna ainda mais complexo pelo pouco conhecimento disponível sobre os mecanismos e fatores que conduzem às alterações cardíacas.

A diminuição da massa cardíaca é acompanhada de perda na função cardíaca e, além disso, as anormalidades cardíacas presentes no paciente com câncer também podem atuar como papel central nos sintomas de fadiga e imobilidade (Schunemann et al., 2008). Tian et al., 2010 sugerem que as alterações cardíacas em um modelo animal de caquexia induzida pelo câncer sejam fibrose, alterações na estrutura do miocárdio e alteração de fibras contráteis como a troponina I e a miosina de cadeia pesada (Tian et al., 2010). Neste estudo, os pesquisadores inocularam células de adenocarcinoma C-26 em camundongos e avaliaram a fração de encurtamento cardíaco, 14 dias após o inóculo. Foram observados nos animais com tumor a redução na fração de encurtamento cardíaco, presença de fibrose e estrutura cardíaca alterada (Tian et al., 2010). No ano seguinte, o mesmo grupo testou a hipótese de que o sistema ubiquitina proteassoma poderia mediar a proteólise no músculo cardíaco, levando a uma perda de massa cardíaca. De fato, foi encontrado aumento na expressão de MuRF-1 e Atrogin-1 e alto nível de ubiquitinação proteica no coração de animais com tumor sugerindo o envolvimento do complexo enzimático ubiquitina proteassoma na alteração de massa cardíaca (Tian et al, 2011). Já Cramer et al., 2014 evidenciaram em estudo prospectivo, redução da fração de ejeção do ventrículo esquerdo em pacientes com câncer colorretal, a qual era similar entre pacientes com e sem tratamento quimioterápico (Cramer et al., 2014). No geral, esses estudos suportam a ideia de que a redução da função cardíaca pode ser, em parte, responsável pelos sintomas de fadiga e morbidade que em conjunto conduzem ao agravamento da doença.

Os mecanismos moleculares e celulares relacionados à atrofia cardíaca em modelo de caquexia do câncer parece estar associada à inibição do crescimento através da ativação de receptor de activina IIB (activin receptor type IIB, ActRIIB), seguida da estimulação da subfamília de TGF β , incluindo miostatina, activina, *growth differentiation factor 11* (GDF11), entre outros. No estudo de Zhou et al, 2010, o bloqueio da via da ActRIIB foi capaz de reverter a atrofia cardíaca em um modelo experimental de células tumorais de cólon, sendo também capaz de prevenir e reverter a perda de massa muscular neste

modelo. De forma geral, o trabalho mostrou que a manutenção das massas musculares esquelética e cardíaca impactou diretamente na sobrevivência dos animais (Zhou et al., 2010).

Outro fator envolvido nas alterações cardíacas desencadeadas no câncer está relacionado à inflamação presente na síndrome. Citocinas inflamatórias contribuem para as alterações cardíacas na caquexia do câncer. A inflamação crônica está presente na maioria das doenças crônicas como câncer, insuficiência cardíaca, diabetes e doenças pulmonares (Argilés et al., 1997, 2014; Dobaczewski et al., 2011; Fearon et al., 2012, 2013). Sendo assim, não é surpreendente que essa inflamação promova alterações celulares que conduzem ao prejuízo funcional do tecido. Em estudos com animais, Muhlfeld et al., 2011, inocularam o carcinoma pulmonar de Lewis em camundongos e avaliaram a função cardíaca, os níveis de TNF- α , IL-6 e a inervação cardíaca após 21 dias do inóculo. Foram encontrados diminuição do volume miofibrilar, aumento do volume sarcoplasmático e lipídico, alterações na estrutura cardíaca, redução da inervação do ventrículo esquerdo e aumento dos níveis séricos de TNF- α e IL-6 nos animais com tumor (Muhlfeld et al., 2011).

Além das alterações morfológicas, funcionais e inflamatórias, alguns estudos já demonstraram que as alterações metabólicas também estão presentes no tecido cardíaco no câncer. No estudo de Drott e Lundholm 1990, já havia sido observado que o coração de animais com tumor apresentava elevada taxa de consumo de oxigênio e alterações em seu metabolismo. Neste estudo, o aumento do metabolismo cardíaco em animais com tumor estava associado à diminuição da captação de glicose, liberação de lactato, glicerol e aminoácidos. Corroborando o estudo, Schafer et al. 2016, demonstraram que a sinalização tumoral impacta o sistema cardíaco através de mediadores chamados de “caquexinas”, as quais desencadeiam atrofia cardíaca e alterações no metabolismo de ácidos graxos nos cardiomiócitos. Por fim, esses resultados indicam perturbações metabólicas e energéticas nos cardiomiócitos, sendo algumas similares às observadas durante a insuficiência cardíaca. Importante, fica evidente a importância de estudar diferentes modelos

experimentais de câncer e suas alterações específicas considerando o cenário dos diferentes efeitos e alterações presentes no tecido cardíaco.

Em relação à pré existência da cardiopatia ou risco cardiovascular no paciente com câncer, há indícios de manifestações clínicas similares para pacientes com algum tipo de doença cardiovascular e o paciente com câncer. No estudo citado acima, Cramer et al., 2011, descreve que pacientes com insuficiência cardíaca e pacientes com câncer possuem taquicardia, fração de ejeção do ventrículo esquerdo reduzida, dispneia, fadiga e capacidade reduzida de se exercitar. Von Haehling et al., 2013, avaliaram a função cardíaca de pacientes com câncer e compararam com sujeitos saudáveis e pacientes com insuficiência cardíaca. Encontraram valores elevados para pressão arterial média, volume sistólico e débito cardíaco reduzidos no repouso, o que representa aumento do risco cardiovascular para pacientes com câncer quando comparados ao grupo controle. No entanto, apesar da associação entre insuficiência cardíaca e câncer na literatura, há pouca discussão sobre os efeitos da caquexia nas alterações cardíacas na presença de fatores de risco cardiovasculares e morbidade. Dessa forma, existe uma grande lacuna de conhecimento na literatura sobre os efeitos da caquexia do câncer em pacientes com fatores de risco pré existentes ou insuficiência cardíaca.

O avanço das tecnologias no tratamento do câncer resulta em maior sobrevida dos pacientes oncológicos. Assim, o maior tempo de vida está associado à maiores chances da ocorrência de efeitos deletérios no sistema cardiovascular. Neste sentido, o cuidado desses pacientes se tornou ainda mais importante ao longo dos anos.

Atualmente, cardiologistas e oncologistas trabalham juntos para explorar modelos de tratamento e melhorar as condições de pacientes com câncer apresentando elevado risco de alterações morfofuncionais cardíacas, as quais afetarão diretamente a tolerância ao tratamento, nível de fadiga, qualidade de vida, e consequentemente, a sobrevida. Vale ressaltar que há necessidade de avaliação cardíaca de forma contínua nos pacientes com câncer, principalmente, àqueles com comorbidades e fatores de risco. Ademais,

intervenções que agreguem valor ao tratamento multidisciplinar do câncer, como o exercício físico, podem ser estudados como uma forma de atenuar ou prevenir desordens cardiovasculares, consequentemente, aumentar a qualidade de vida e a longevidade.

2.4 Adaptações cardíacas ao exercício físico

Uma das funções básicas do músculo cardíaco é bombear sangue para manter o suporte de nutrientes e oxigênio para todo o organismo. Para que isso ocorra, o trabalho cardíaco é sustentado por um complexo sistema metabólico e contrátil capaz de garantir sua máxima eficiência. Além disso, o tecido cardíaco é capaz de se adaptar às diferentes situações que requerem maiores demandas energéticas, como por exemplo, durante o exercício físico. Cronicamente, a sobrecarga hemodinâmica (aumentos de pré-carga) imposta ao coração durante o exercício físico aeróbio gera a hipertrofia dos cardiomiócitos. Esse crescimento fisiológico é acompanhado por uma função contrátil normal em repouso, aumento da espessura da parede cardíaca e alterações no volume ventricular. Entretanto, da mesma forma que o músculo cardíaco se adapta ao estímulo fisiológico do exercício físico, há também um remodelamento que ocorre em situações patológicas e geram hipertrofia das células cardíacas, no entanto, acompanhadas de disfunção contrátil.

Os benefícios da prática de exercícios físicos regulares são multifatoriais e demonstram a resposta integrada de diversos órgãos e sistemas. O remodelamento cardíaco é específico para o tipo de estímulo (neuro-humoral e mecânico) dado ao sistema cardiovascular, portanto, as adaptações cardíacas ocorrem em resposta ao tipo de sobrecarga imposta ao coração (Scheuer e Tipton, 1977; Blomqvist e Saltin, 1983). No exercício físico aeróbio, há aumento considerável do retorno venoso ao coração gerando um aumento na contratilidade cardíaca para maior eficiência na ejeção de sangue para o

sistema. Considerando isso, no exercício físico aeróbio há uma sobrecarga de volume induzindo o remodelamento cardíaco fisiológico com padrão preferencialmente excêntrico. A hipertrofia de origem fisiológica é reversível e sem consequências adversas aparentes (Maillet et al., 2013), no entanto, independentemente da origem e causas da hipertrofia cardíaca, essa deve ser modesta ou não evidente (Tardiff, 2011). Já a hipertrofia patológica, em longo prazo e com a progressão da doença, conduz à diminuição da função cardíaca, dilatação da câmara cardíaca e diminuição da espessura da parede cardíaca (Vega et al., 2017). Apesar dessas manifestações, o crescimento do miócito cardíaco ocorre de maneira progressiva fazendo com que a detecção precoce da alteração da estrutura cardíaca assintomática seja muito difícil.

Outro aspecto importante, é que as alterações nos miócitos cardíacos em condições patológicas são acompanhadas do acúmulo de colágeno ou fibrose intersticial e desarranjo celular (Varnava et al., 2001) levando à disfunção cardíaca.

Além das alterações morfológicas e estruturais do músculo cardíaco, o crescimento patológico conduz à ativação dos chamados “genes fetais” que caracterizam uma reprogramação fetal. Assim, a expressão de genes envolvidos na bioenergética e metabolismo das células cardíacas assume o padrão conhecido como “fetal” fazendo com que toda dinâmica cardíaca fique alterada. A oxidação de glicose para geração de energia passa ser predominante, há diminuição da expressão de genes envolvidos na oxidação de ácidos graxos, como também, de genes da cadeia de transporte de elétrons (Aubert et al., 2013).

Já a via de sinalização conhecida pelo seu papel central na resposta hipertrófica cardíaca é a via *phosphoinositide 3-kinase* (PI3K)/Akt. A quinase Akt atua como uma quinase efetora da sinalização de PI3K, transmitindo os sinais de fatores de crescimento como *insulin-like growth factor 1* (IGF-1) e a própria insulina, sendo essa sinalização fundamental para promoção do desenvolvimento cardíaco (Maillet et al., 2013). Além disso, esses fatores são necessários para induzir o crescimento fisiológico cardíaco em resposta ao

exercício físico. Neste sentido, Riehle e colaboradores (2014), demonstraram em modelo animal com deleção do receptor de IGF-1 específico para cardiomiócitos, que a via de sinalização da insulina está envolvida nos processos de desenvolvimento das células cardíacas em condições basais e em resposta ao exercício físico. Especificamente, o grupo demonstrou que as isoformas do receptor de insulina (IRS1 e IRS2) medeiam a resposta hipertrófica do músculo cardíaco e bioenergética mitocondrial no exercício físico (Riehle et al., 2014). Portanto, o exercício físico figura como importante modulador das adaptações metabólicas e morfológicas do tecido cardíaco em condições basais ou patológicas.

2.5 Exercício físico e caquexia induzida pelo câncer

Os efeitos do TFA já vêm sendo estudado há mais de quatro décadas e já está claro seu papel benéfico em vários fatores de risco para doenças cardiovasculares. Dentre os principais benefícios do TFA, destacam-se: redução da hiperatividade nervosa simpática, remodelamento cardíaco patológico, melhora na função ventricular esquerda, aumento da tolerância aos esforços físicos e mudança no metabolismo muscular esquelético (Rolim, et al., 2007; Oliveira et al., 2009; Antunes-Correa et al., 2011). Entretanto, apesar dos estudos evidenciarem o papel cardioprotetor do exercício físico, ainda não se sabe quais adaptações e mecanismos nos efeitos do exercício físico sobre o músculo cardíaco na caquexia do câncer. Para nosso conhecimento, apenas dois trabalhos demonstraram abordaram esse tema (Padrão et al., 2015, 2018).

Como já mencionado anteriormente, o exercício físico promove efeitos benéficos em relação à prevenção e ao tratamento de doenças. Tais efeitos acontecem em razão de adaptações agudas e crônicas que coordenam o funcionamento integrado de diversos sistemas orgânicos. Coletivamente, essas adaptações contribuem para maximizar o fornecimento de substratos, a capacidade respiratória de mitocôndrias e a função contrátil durante o exercício físico. Em consequência, ocorre melhor rendimento e resposta do organismo

frente ao esforço, resultando na redução do distúrbio homeostático causado pela perturbação metabólica do exercício e, conseqüentemente, aumento da resistência à fadiga e instalação de doenças. (Holloszy e Coyle, 1984; Booth e Thomason, 1991; Egan e Zierath, 2013).

Na caquexia do câncer, a força e função musculares são substancialmente reduzidas, limitando a capacidade de exercer atividades cotidianas e afetam diretamente a qualidade de vida do paciente. Como já descrito anteriormente, a caquexia do câncer é uma síndrome multifatorial e os tratamentos oferecidos na síndrome devem ser multimodais. Neste sentido, o exercício físico figura entre as estratégias promissoras no tratamento do câncer, devido aos seus efeitos multifatoriais, e pela possibilidade de atuação em diferentes vias de sinalização.

Atualmente, existe uma vasta literatura demonstrando, tanto o papel preventivo, como o de tratamento da prática regular de exercício físico sobre uma série de doenças crônico-degenerativas (Pahor et al. 2014; Fiuza-Luces et al. 2013; Flachenecker et al. 2012; Booth et al. 2012; Hillman et al. 2008), incluindo o câncer (Pedersen et al., 2016, Pin et al., 2016 Moore et al, 2016; Friedenreich et al. 2008; Schmitz et al., 2005; Knols et al., 2005; Vogel, 2000; Bal et al., 1999). Em recente trabalho, Moore et al., 2016, reforçam a associação entre maiores níveis de atividade física ao menor risco de diferentes tipos de câncer na população (Moore et al, 2016). A prática regular de atividade física está associada com o menor risco de morte devido ao câncer, particularmente no câncer de mama e colorretal (Campbell et al., 2013; Schmid, D. and Leitzman. 2014). No entanto, esses estudos mostram associações epidemiológicas. Atualmente, mais do que associações epidemiológicas entre os níveis de atividade física e o risco de câncer, os pesquisadores buscam elucidar os mecanismos biológicos que explicam o potencial anticarcinogênico da prática regular de atividade física. A compreensão de tais mecanismos pode ajudar no desenvolvimento de terapias preventivas e tratamentos.

Um ponto importante em relação à capacidade funcional do paciente com câncer é que, além das limitações musculares esqueléticas, há também a disfunção cardíaca que agrava a fadiga e suas limitações. Neste sentido, o exercício físico como forma de prevenção poderia exercer papel fundamental na manutenção da função e massa dos músculos esquelético e cardíaco.

O impacto da capacidade aeróbia na habilidade de prever taxas de mortalidade por doenças cardiovasculares em adultos já é bem conhecido (Carvalho and Mezzani, 2011; Myers, 2008). No entanto, pouco se sabe sobre a importância da capacidade aeróbia no prognóstico de pacientes com câncer. Neste sentido, o exercício físico devido a sua capacidade de atuar em vários órgãos e sistemas figura como uma boa estratégia terapêutica por atenuar ou prevenir as morbidades associadas ao câncer, principalmente de origem cardiovascular, e deveria fazer parte de um programa padrão de tratamento após o diagnóstico de câncer.

Devido ao seu reconhecido efeito sistêmico, o exercício físico tem motivado muitos pesquisadores a sugerirem miocinas, moléculas derivadas do músculo esquelético que tem sua síntese e secreção estimuladas pelo exercício físico como mediadoras da sinalização entre diferentes órgãos de maneira autócrina, parácrina e endócrina (Antunes et al., 2018; Pedersen et al., 2016). Uma dessas miocinas é a IL-6 que em resposta ao exercício físico exerce seus efeitos benéficos na inflamação e na progressão tumoral.

No contexto das alterações cardíacas, algumas miocinas como *follicle-stimulating-like 1* (Fstl1), *vascular endothelium growth factor* (VEGF) e IL-8 (Lombardi et al., 2017) parecem exercer algumas funções no tecido cardíaco, sugerindo a comunicação entre o músculo esquelético e cardíaco. Já as cardiomiocinas, miocinas produzidas pelo coração, ainda não foram exploradas gerando uma lacuna na literatura sobre seus efeitos, isso ocorre principalmente devido à limitação de realização de biópsias do tecido cardíaco. Até onde conhecemos, pelo menos uma citocina foi descrita como produzida e secretada pelo coração, a *mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor* (MANF) (Glembotski,

2011), possibilitando a busca de novas moléculas a serem descobertas, inclusive no contexto da caquexia do câncer.

Dessa forma, novos estudos devem ser desenvolvidos a fim de melhor compreender as alterações do músculo cardíaco, especificamente no câncer, e a fim de avaliar os efeitos do exercício físico sobre a prevenção ou atenuação dos danos na função cardíaca, sobre a qualidade de vida e sobrevida de pacientes com caquexia no câncer. Além disso, é necessário desvendar os mecanismos moleculares pelos quais as alterações no tecido cardíaco ocorrem no câncer, e identificar se o exercício físico é capaz de modulá-los, uma vez que tais questões ainda não foram elucidadas pela literatura. Portanto, no presente projeto de pesquisa utilizamos o exercício físico aeróbico como prevenção e tratamento em animais com caquexia do câncer, objetivando atenuar os danos cardíacos decorrentes da caquexia do câncer.

3 JUSTIFICATIVA

Diante do impacto da caquexia do câncer na qualidade de vida, resposta ao tratamento e sobrevida dos pacientes com câncer, e considerando que o câncer é a principal causa de morte na maioria dos países desenvolvidos (Jemal et al., 2011; Siegel et al., 2011), é de grande relevância buscar compreender melhor a doença, o acometimento de diferentes tecidos, e potenciais formas de tratamento e prevenção.

As alterações cardíacas encontradas na caquexia do câncer parecem comprometer ainda mais a resposta ao tratamento, qualidade de vida e sobrevida do paciente com câncer (Blauwhoff-Buskermolen et al., 2017; Porporato, 2016). Neste sentido, estratégias capazes de atenuar o remodelamento cardíaco, além da disfunção cardíaca e energética constituem um grande desafio.

Vale ressaltar que a disfunção e remodelamento cardíaco representam um componente pouco explorado na caquexia do câncer, os possíveis mecanismos e implicações funcionais ainda são incipientes em modelos experimentais de tumores sólidos associados à caquexia. Além disso, o efeito do treinamento físico aeróbio sobre as alterações cardíacas no modelo CT26 de caquexia ainda não foi estudado.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos do treinamento físico aeróbio sobre a função e estrutura cardíacas em modelo animal de caquexia induzida pelo câncer.

4.2 Objetivos específicos

4.2.1 Caracterizar o modelo CT26 de caquexia do câncer em camundongos BALB/c e os parâmetros funcionais e morfológicos cardíacos após inoculação de células do adenocarcinoma de cólon (CT26).

4.2.2 Avaliar o efeito do treinamento físico aeróbio (TFA) na estrutura e função do músculo cardíaco de camundongos saudáveis e com inóculo das células do adenocarcinoma de cólon CT26.

4.2.3 Avaliar mecanismos celulares e moleculares associados às alterações cardíacas encontradas em camundongos inoculados com células CT26 e o efeito do TFA.

5 MÉTODOS

5.1 Aprovação no Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)

Esse trabalho foi submetido aos Comitês de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (#115/16) e da Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo com registro de protocolo número #2016/02 e #2014/08. Além disso, esse trabalho segue os princípios éticos na experimentação animal seguindo 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).

5.2 Amostra e desenho experimental

Foram utilizados camundongos machos da linhagem Balb/c com 6 a 12 semanas de idade, os quais foram mantidos no biotério da Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo (EEFE-USP), com temperatura controlada entre 22 e 25°C e ciclo claro-escuro invertido (12 horas). Água e comida foram administradas *ad libitum*. Os tecidos de interesse foram adequadamente coletados e armazenados conforme as análises a que foram submetidos. Os animais foram randomizados em grupo de camundongos saudáveis controle (Controle), inoculados com células do adenocarcinoma de cólon 26 (CT26) e sedentários (CT26 SED) e treinados (CT26 TR). Os animais treinados realizaram o protocolo de treinamento físico em esteira durante todo o período experimental (Figura 3).

Figura 3. Desenho experimental do modelo de caquexia CT26.

5.3 Protocolo de treinamento físico aeróbio

O TFA foi realizado segundo o protocolo desenvolvido por Ferreira e seus colaboradores em sistema de esteira (Ferreira et al., 2007) durante 45 dias (30 dias antes + 15 dias após o inóculo das células tumorais), 5 dias por semana por 60 minutos de duração. Antes de cada sessão, os animais realizaram um aquecimento de 5 minutos a velocidade de 10m/min e a velocidade foi progressivamente aumentada até atingir 60% da velocidade máxima atingida no teste de exaustão, a qual corresponde a intensidade de máxima fase estável de lactato. Esse trabalho é caracterizado como de moderada intensidade com predomínio de metabolismo aeróbio. As sessões de treinamento físico foram realizadas durante a fase escura do ciclo claro/escuro do animal.

5.4 Teste incremental máximo em esteira rolante.

Todos os animais foram adaptados a esteira rolante por 4 dias consecutivos, 10 min/dia, em velocidades variadas. Após adaptação, os animais foram submetidos a um teste incremental máximo, previamente padronizado em nosso laboratório, com velocidade inicial da esteira rolante de 6 m/min e com incrementos de 3 m/min a cada 3 minutos (Ferreira et al., 2007). O teste foi interrompido quando o animal demonstrava sinais claros de exaustão, ou seja, incapacidade de manter o padrão de corrida. Foi anotada a velocidade máxima ($V_{m\acute{a}x}$) atingida e a distância total percorrida no teste incremental, índices utilizados para aferir a capacidade máxima de corrida do animal. O teste máximo foi realizado no início do período experimental para avaliar a capacidade física dos animais e randomização entre os grupos ativo e sedentário e no período pré inóculo das células tumorais (período pós TFA de 45 dias) para avaliar a efetividade do TFA. O teste máximo não foi realizado no período pós inóculo das células tumorais devido à incapacidade física dos animais em realizá-lo.

5.5 Células CT26: Cultura celular e Inóculo

As células CT26 foram fornecidas pelo Prof. Dr. Roger Chammas do Instituto de Câncer do Estado de São Paulo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Foram inoculadas $2,0 \times 10^6$ células na região subcutânea do flanco superior direito dos camundongos, sendo essa concentração previamente padronizada na literatura (Das et al., 2011) e previamente utilizada em nosso laboratório (Tobias, 2017).

As células CT26 tumorais foram cultivadas em meio *Dulbecco's modified Eagle's* (DMEM; Gibco, NY, EUA), suplementadas com 10% de soro fetal bovino (Gibco, NY, EUA) e 1% *penicillin-streptomycin* a 37°C com 5% de CO₂. As células viáveis foram concentradas em $2,0 \times 10^6$ e diluídas em 100 µL de meio livre de soro DMEM e injetadas no flanco direito de um animal.

5.6 Medidas ecocardiográficas

A avaliação da função ventricular foi realizada por medida ecocardiográfica de acordo com as recomendações da Sociedade Americana de Ecocardiografia (SAHN et al., 1978). O exame ecocardiográfico transtorácico foi realizado por um único observador (ecocardiografista Paulo Magno), cego para o grupo experimental, em período prévio e após o inóculo das células tumorais. Em cada exame foi coletado um total de cinco medidas para cada variável, sendo calculadas posteriormente as médias aritméticas dessas medidas. O animal foi posicionado lateralmente, a fim de expor o hemitórax esquerdo que foi cuidadosamente depilado. Sobre o precórdio do animal, foi aplicado um gel de transmissão para ultrassom de viscosidade média/alta (General Imaging Gel, ATL. Reedsville, EUA). O exame ecocardiográfico foi realizado utilizando o equipamento VEVO 2.100 (VisualSonics Inc, Toronto, Canadá) equipado com transdutor (MS550D) de 40 MHz, em animal anestesiado com isoflurano (1.5-2% com 1 L/min 100% O₂). Para a medida das estruturas cardíacas foram utilizadas imagens em modo M

com o feixe de ultra-som orientado pela imagem bidimensional com o transdutor na posição para-esternal eixo menor. A imagem da cavidade ventricular esquerda foi obtida posicionando o cursor do modo M logo abaixo do plano da valva mitral entre os músculos papilares. As imagens da aorta e do átrio esquerdo também foram obtidas na posição para-esternal eixo menor com o cursor do modo M posicionado ao nível da valva aórtica. Após a realização das medidas foi calculada a fração de encurtamento (FE) do ventrículo esquerdo ($\%FE = [(DDFVE - DSFVE) / DDFVE] \times 100$), utilizado como índice de função sistólica. O exame foi realizado em colaboração com o Dr. Paulo Magno do Instituto do Coração (InCor-FMUSP), ecocardiografista experiente, cego para a condição física dos animais.

5.7 Análise morfológica cardíaca

Para as análises histológicas, o coração foi fixado em paraformaldeído a 4% por um período de 48h à temperatura ambiente. Em seguida os tecidos foram desidratados por lavagem com etanol 70%. Após a lavagem, o tecido passou por um processo de fixação em parafina por 48h, e posteriormente foi submetido ao processamento histológico com cortes de 5 μ m ao longo de seu maior eixo (Savergnini et al., 2013). Foi realizada a medida do diâmetro transversal dos cardiomiócitos (corado com hematoxilina e eosina) e a avaliação do grau de fibrose do miocárdio (corado com *Picrosirius Red*).

Todas as análises foram realizadas em corte transversal do músculo cardíaco. 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. O diâmetro dos cardiomiócitos foi calculado a partir de uma média de 60 medidas por animal. Para a análise do grau de fibrose, os cortes foram corados com *Picrosirius red* e foi realizada uma varredura completa ventricular por sistema computadorizado (Imaging Software NIS- Elements AR 3,1). As imagens foram capturadas em objetiva 40x. Estas análises tiveram como objetivo identificar possíveis alterações

histopatológicas decorrentes da disfunção cardíaca no câncer, bem como os possíveis benefícios do TFA.

5.8 Avaliação da área de infiltração por células hematopoiéticas

A inflamação presente no tecido cardíaco foi registrada por captação microscópica com aumento de 20x da área de infiltração por células hematopoiéticas em cortes corados com hematoxilina e eosina (H&E). A área de infiltrados proporcional à área total foi classificada de acordo com a escala descrita por Ciháková et al., 2004 (Ciháková et al., 2004): grau 0, ausência de inflamação; grau 1, <10% da seção do coração é infiltrado; grau 2, 10-30%; grau 3, 30 a 50%; grau 4, 50-90%; e grau 5, > 90%. Em resumo, foram selecionados três campos do ventrículo esquerdo e três campos do ventrículo direito da área transversal do coração para quantificar áreas específicas com infiltrados inflamatórios. A demarcação da área infiltrada foi realizada no software ImageJ e quantificada em volume para a área total do campo analisado.

5.9 Crescimento tumoral e massa corporal

A avaliação do crescimento tumoral foi realizada diariamente após a injeção das células tumorais utilizando um paquímetro. Foram mensurados o maior e o menor diâmetro, longitudinal e transversal, respectivamente. Os valores obtidos foram utilizados na fórmula a seguir para estimativa do volume tumoral: $V = 0,52 \times (\text{maior diâmetro}) \times (\text{menor diâmetro})^2$. A densidade do tumor de um lote experimental foi calculada. Dessa forma, a massa do tumor durante o seguimento foi estimada multiplicando o volume estimado pela densidade média calculada. A massa corporal foi aferida a cada dois dias na parte da manhã (início do ciclo escuro dos animais) em balança digital

(Gehaka, São Paulo, Brasil). A massa tumoral estimada foi subtraída da massa corporal final.

5.10 Método de eutanásia

Após a anestesia com isoflurano, os camundongos foram mortos por deslocamento cervical seguindo os preceitos éticos do Guia brasileiro de produção, manutenção ou utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (1ª edição, 3/02/2016).

5.11 Expressão gênica

A expressão dos genes de interesse, a saber: a) ANP, BNP, TGF- β 1, Smads 2/3 e SDHA foram avaliados por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qRT-PCR). Foram testados dois genes normalizadores: ciclofilina e GAPDH. Para isso, foi realizado o isolamento do RNA total utilizando RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit (Invitrogen, Brasil). As concentrações e a pureza do RNA foram determinados por espectrofotometria (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, EUA) e por gel de agarose 1% marcado com Nancy-520 (Sigma-Aldrich, SP, Brasil). A transcrição reversa do RNA (síntese de cDNA) foi realizada utilizando Revertaid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, EUA) seguindo as instruções do fabricante. A expressão gênica foi avaliada por qRT-PCR (ABI Prism 7500, Applied Biosystems, EUA) utilizando primers específicos e Maxima® SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Fermentas, EUA). Os resultados foram expressos utilizando o método de limiar comparativo de ciclos ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) como descrito pelo fabricante. Os primers específicos de cada gene foram desenhados de acordo com as sequências disponíveis no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>) utilizando a ferramenta Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>).

Gene	Forward (5' > 3')	Reverse (5' > 3')
mmu-Smad3	AAGAAGCTCAAGAAGACGGGG	CAGTGACCTGGGGATGGTAAT
mmu-TGFbeta1	GTCAGTGGAGTTGTACGGCA	AGCCCTGTATCCGTCTCCT
mmu-Smad2	AATCTTTGTGCAGAGCCCCA	TTACAGCCTGGTGGGATCTT
mmu- ANP	TTGGCTCCAGGCCATATTG	AGGTGGTCTAGCAGGTTCTT
mmu-BNP	CACCGCTGGGAGGTCCT	GTGAGGCCTTGGTCCTTC
mmu-SDHA	GGAACACTCCAAAAACAGACCT	CCACCACTGGGTATTTGAGTAGAA

5.12 Expressão Proteica

O lisado total do coração dos animais dos grupos controle, CT26 SED e CT26 TR foram carregados em géis de poliacrilamida (10%), submetidos à eletroforese, e as proteínas foram transferidas por eletrotransferência para a membrana de nitrocelulose (BioRad Biosciences; Piscataway, NJ, EUA). A coloração foi feita com Ponceau S a 0,5% e usada para monitorar a carga igual de amostras e transferir a para a membrana de transferência. A membrana transferida foi então bloqueada (leite seco desnatado a 5%, Tris-HCl 10 mM (pH = 7,6), NaCl 150 mM e Tween 20 a 0,1%) por 1 h à temperatura ambiente. Em seguida, as membranas foram incubadas durante a noite a 4°C com anticorpos específicos contra o conjunto de proteínas do complexo mitocondrial (conjunto total de anticorpos para roedores OXPHOS da MitoSciences -MS604, Eugene, Oregon (EUA) e GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, EUA) como controle interno. A ligação do anticorpo primário foi detectada com o uso de anticorpo secundário do mesmo hospedeiro por 1h à temperatura ambiente (1: 10000 LICOR) e a detecção foi realizada com o scanner e o software LICOR Odyssey® (LI-COR Biosciences, USA). Todas as membranas foram visualizadas no canal 800. A análise de quantificação dos blots foi realizada com o uso do software ImageJ. As amostras foram normalizadas para alterações relativas no GAPDH e expressas como porcentagem do grupo controle.

5.13 Função Mitocondrial

Para a avaliação da função mitocondrial, foi realizado o ensaio de consumo de O₂ em frações mitocondriais extraídas do músculo cardíaco de camundongos. Após, foram realizados o isolamento das mitocôndrias e o consumo de oxigênio em oxígrafo.

5.13.1 Isolamento das mitocôndrias

Logo após o sacrifício dos animais, todo o tecido cardíaco, com exceção dos átrios, foi retirado, removendo também os tecidos conjuntivos. O tecido foi colocado no tampão de lise (300 mM sacarose, 10 mM Hepes, 2 mM EGTA, pH 7,2 a 4°C.), processado em pedaços pequenos durante 10 minutos em becker com tampão de isolamento. O tecido processado foi transferido para um homogeneizador mecânico Potter. Após isso, o concentrado foi centrifugado a 950g por 5 minutos, e o sobrenadante foi centrifugado duas vezes em 10.000g por 10 minutos. O *pellet* mitocondrial foi ressuspendido em 90µl de tampão de isolamento para dosagem de proteínas e realização do ensaio de respiração mitocondrial.

5.13.2 Consumo de oxigênio na mitocôndria isolada

A medida do consumo de oxigênio mitocondrial foi realizada utilizando-se um eletrodo específico de oxigênio (do tipo Clark) acoplado a um registrador (Oxygraph System, Hansatech, UK). O eletrodo é composto por um cátodo de platina e um ânodo de prata, imersos em solução eletrolítica de cloreto de potássio (KCl). A reação se processa pela corrente gerada entre os eletrodos e é relacionada à concentração de oxigênio na superfície do cátodo. Cada amostra de mitocôndria foi diluída em tampão de KCL numa concentração final de proteína de 0,250mg/ml. Os registros de consumo de oxigênio foram feitos na presença de succinato (2mM), malato-glutamato (2mM) e adenosina difosfato (ADP, 1mM). Um inibidor do complexo V (Oligomicina 1µg/ml) foi

adicionado para inibir sua atividade durante esse ensaio. Além disso, utilizamos um desacoplador da membrana interna da mitocôndria (CCCP – Carbonyl Cyanide m-Chlorophenyl Hydrazone, 1 μ M) para estimular o consumo máximo de oxigênio. Os valores foram expressos em micromoles por minuto por miligrama de proteína.

5.14 Análise estatística

Inicialmente a distribuição dos dados foi testada por meio do teste de normalidade Shapiro-Wilk (GraphPad Prism software 7.0). Os dados estão apresentados na forma de média $\pm$ erro padrão e comparados pela análise de variância (ANOVA) de um caminho e para comparação de dois grupos independentes, o teste *t* de *Student* foi adotado. Para amostras que não apresentavam distribuição normal, o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Os testes utilizados são mencionados nas legendas das figuras. Quando diferenças significantes foram encontradas nos testes de ANOVA foi utilizado o *post-hoc* de Bonferroni. Foi adotado o nível de significância $p \leq 0,05$.

6 RESULTADOS

Para melhor entendimento dos resultados, essa seção foi dividida em duas diferentes subseções, sendo: **6.1** Caracterização do modelo experimental de caquexia do câncer CT26 **6.2** Efeito do treinamento físico aeróbio sobre a estrutura e função do músculo cardíaco no modelo experimental de caquexia do câncer CT26; e **6.3** Efeito do treinamento físico aeróbio nas alterações proteicas e gênicas do músculo cardíaco de camundongos do modelo experimental de caquexia do câncer CT26.

6.1 Caracterização do modelo experimental de caquexia do câncer CT26

Para esse estudo procuramos responder à seguinte pergunta: o modelo do adenocarcinoma de cólon (CT26) gera o fenótipo de caquexia acompanhado de disfunção cardíaca?

Para isso, camundongos foram randomizados para compor os seguintes grupos: 1) grupo de animais inoculados com as células tumorais CT26 (CT26) e 2) grupo de animais saudáveis (Controle) (Figura 4).

Figura 4. Desenho experimental do modelo de caquexia do câncer CT26 sem intervenção do TFA.

Baseado em estudo piloto prévio, determinamos os tempos de coletas e análises para o modelo experimental CT26, o qual segue detalhado na Figura 4, onde o desenho experimental é apresentado. A concentração de células tumorais inoculadas nos animais foi determinada de acordo com um levantamento de estudos experimentais de caquexia do câncer, independente do tipo de célula tumoral. O período determinado para o crescimento tumoral e o local de inóculo das células foi definido de acordo em estudos prévios que respeitavam o bem-estar dos animais e fossem suficientes para indução das características da caquexia (Kim et al., 2016; Workman et al., 2010).

Como esperado, o modelo experimental CT26 confirmou ser um bom modelo de caquexia de acordo com o período e concentração de células definidos. Em nossos resultados encontramos redução significativa da massa corporal a partir do décimo segundo dia (Figura 5A), onde camundongos Balb/c foram injetados com a quantidade de 2×10^6 de células tumorais CT26. Na figura 5B e 5C, podemos ver detalhadamente a massa corporal inicial (PCI) e final livre da massa do tumor (PCFst) e a massa do tumor. A massa tumoral (g) atingiu aproximadamente uma média de 0,4g entre os animais, e corresponde

a 1,4% do peso corporal final dos animais (Figura 5B). Vale considerar, que as variações na severidade da caquexia têm sido atribuídas às variações no fenótipo tumoral ou genótipo do hospedeiro, implicando no papel da interação entre tumor e hospedeiro (Monitto et al., 2001).

Os animais do modelo CT26 também apresentaram grande perda de massa muscular representada pela redução significativa de massa (mg)/comprimento da tíbia (mm) dos músculos esqueléticos tibial anterior, sóleo e gastrocnêmio (Figura 5D). Como já visto em estudos anteriores do nosso laboratório, há uma característica interessante na preservação de massa de tecidos com metabolismo oxidativo predominante, como é o caso do músculo sóleo. Mesmo assim, no nosso modelo, a caquexia afetou a musculatura esquelética independente do metabolismo muscular predominante. Por fim, encontramos em nossos resultados perda significativa de tecido adiposo epididimal também característico na caquexia (Figura 5E).

Figura 5. Inóculo subcutâneo de células do adenocarcinoma de cólon (CT26) induzem caquexia. (A) Variação da massa corporal total em gramas durante 19 dpi (g), **(B)** Peso corporal inicial (PCI) peso corporal final sem a massa tumoral (PCTst) e massa tumoral em gramas (g) de camundongos CT26. **(C)** Massa corporal livre do tumor (g). **(D)** Massa do músculo esquelético tibial anterior (mg)/comprimento da tíbia (mm); sóleo (mg)/comprimento da tíbia (mm) e gastrocnêmio (mg)/comprimento da tíbia (mm). **(E)** Massa da gordura epididimal(mg)/comprimento da tíbia (mm). **(F)** Imagem representativa da porção anterior e lateral da pata de caundongos controle e CT26. Dados em média $\pm$ erro padrão. *p<0,05; **p<0,01, ****p<0,001 indicam diferença significativa usando teste *t* de *Student* com correção de Welch e análise de

variância (ANOVA) para dados com dois fatores independentes (condição; controle vs CT26; tempo; dias) com *post-hoc* de *Bonferroni*.

Como descrito anteriormente, a caquexia é uma síndrome que atinge múltiplos órgãos. Assim, em nosso modelo outros órgãos foram afetados, descritos pelo aumento significativo da relação do massa úmida/seca do fígado (Figura 6A) e uma tendência ($p=0,0634$) para o pulmão sugestiva de edema pulmonar (Figura 6B). Interessante, encontramos um aumento de magnitude considerável no baço dos animais do grupo CT26 definida como esplenomegalia (Figura 6C). O baço tem como principal função a remoção de eritrócitos envelhecidos, hematopoiese, reciclagem de ferro, reserva de células vermelhas que servem como suporte após evento hemorrágico, além disso, possui papel importante no sistema imune. A esplenomegalia já é reportada clinicamente no câncer e indica o mau funcionamento desse órgão e grave anemia do paciente. Em camundongos, o aumento do baço é facilmente identificado como ilustrado na Figura 6D.

Figura 6. Caquexia do câncer induz alteração de diferentes tecidos de camundongos inoculados com células tumorais do carcinoma de cólon

(CT26). (A, B) Massa em mg do fígado e pulmão no estado úmido/estado seco (U/S), respectivamente. **(C)** Massa do baço (mg)/comprimento da tibia (mm) **(D)** Imagem representativa do baço de um camundongo injetado com células CT26 (esquerda) ao lado de um baço de camundongo controle saudável. Dados em média $\pm$ erro padrão. * $P < 0,05$ e ** $p < 0,01$ indicam diferença significativa usando teste *t* de *Student* com correção de Welch para dados com diferente número amostral.

Para as alterações do músculo cardíaco observamos diminuição da massa cardíaca total (Figura 7A) e tendência ($p=0,06$) à diminuição para o diâmetro transverso de cardiomiócitos demonstrados na Figura 7B. Acompanhado dessas alterações, na Figura 8A e 8B, observamos a diminuição significativa da fração de ejeção e encurtamento do ventrículo esquerdo de camundongos inoculados com células CT26, caracterizando disfunção ventricular esquerda que corrobora os dados de perda de massa cardíaca. Em relação aos outros parâmetros de espessura e diâmetro das estruturas cardíacas, observamos diferença significativa apenas na diminuição do septo e aumento do diâmetro do VE em diástole no grupo CT26 após 16 dias de inóculo das células tumorais (Tabela 1). O remodelamento cardíaco está associado a diferentes mecanismos relacionados à disfunção cardíaca, que incluem desde a alteração na geometria (forma elíptica para esférica) como na espessura da parede do ventrículo e diâmetro da cavidade do VE. Vale ressaltar que os parâmetros cardíacos de espessura e diâmetro do VE parecem ser influenciados de acordo com a progressão e estágio da doença.

Figura 7. Caquexia do câncer promove remodelamento do músculo cardíaco. (A) Massa cardíaca (mg)/comprimento da tíbia (mm) após 19 dias de inóculo das células tumorais do carcinoma de cólon em camundongos. **(B)** Diâmetro transversal de cardiomiócitos quantificados na parede livre do ventrículo esquerdo (controle n=5, CT26 n=8). Dados em média $\pm$ erro padrão. * $P < 0,05$ indica diferença significativa usando teste *t* de *Student* com correção de Welch para dados com número amostral diferente.

Figura 8. Caquexia do câncer no modelo CT26 diminui a função cardíaca. (A) Fração de ejeção e **(B)** Fração de encurtamento de camundongos controle e CT26 16 dias após injeção (dpi) das células tumorais CT26. Dados em média $\pm$ erro padrão. * $p < 0,05$ indica diferença significativa usando teste *t* de *Student* com correção de Welch para dados com diferente número amostral.

Tabela 1. Parâmetros ecocardiográficos do modelo experimental CT26.

	Pré Inóculo		Pós 16 dias do inóculo	
	Controle (n=5)	CT26 (n=12)	Controle (n=5)	CT26 (n=12)
DVED (mm)	3,51 ± 0,69	3,77 ± 0,38	3,97 ± 0,36	4,10 ± 0,54#
DVES (mm)	2,11 ± 0,46	2,31 ± 0,34	2,13 ± 0,60	2,62 ± 0,57
SIVD (mm)	0,66 ± 0,08	0,61 ± 0,14	0,61 ± 0,07	0,56 ± 0,09*
SIVS (mm)	0,99 ± 0,16	0,95 ± 0,17	0,92 ± 0,07	0,95 ± 0,14
DPVED (mm)	0,66 ± 0,10	0,63 ± 0,13	0,63 ± 0,10	0,61 ± 0,13
DPVES (mm)	0,97 ± 0,20	1,02 ± 0,16	1,00 ± 0,19	1,08 ± 0,17

DVED, diâmetro do ventrículo esquerdo na diástole; DVES, diâmetro do ventrículo esquerdo na sístole; SIVD, septo interventricular na diástole; SIVS, septo interventricular na sístole; DPVED, diâmetro da parede posterior do ventrículo esquerdo na diástole; DPVES, diâmetro da parede posterior do ventrículo esquerdo na sístole (mm). Dados comparados entre os grupos pela análise de variância de dois fatores (ANOVA) com *post-hoc* de *Bonferroni* ($p < 0,05$). *vs. controle 16 dias após injeção das células tumorais; #vs. ele mesmo no período pré.

Concluindo os resultados para o objetivo específico I, podemos considerar que o modelo CT26 apresentado possui resultados consistentes para caracterizá-lo como modelo de caquexia do câncer de acordo com as variáveis de massa corporal, massa muscular e adiposa. Sendo associado à disfunção e atrofia cardíacas.

Após o estabelecimento do período experimental e da caracterização da caquexia e disfunção cardíaca no modelo CT26, o próximo passo foi o de avaliar se o treinamento físico aeróbio (TFA) promoveria alterações suficientes para atenuar os efeitos deletérios da caquexia do câncer. Os resultados deste objetivo está no item a seguir.

6.2 Efeito do treinamento físico aeróbio sobre a estrutura e função do músculo cardíaco no modelo experimental de caquexia do câncer CT26

Na segunda etapa do estudo, buscamos responder a seguinte pergunta: o treinamento físico aeróbio será capaz de atenuar a disfunção cardíaca nos modelo CT26?

Para isso, camundongos foram randomizados para compor os seguintes grupos experimentais: **1)** animais saudáveis sedentários (Controle); **2)** animais sedentários injetados com as células tumorais CT26 durante 19 dias (CT26 SED) e **3)** animais treinados em esteira rolante durante 45 dias e injetados com células tumorais CT26 durante 19 dias (CT26 TR). Estabelecemos assim, o desenho experimental desse estudo conforme a Figura 9.

Figura 9. Desenho experimental do modelo do adenocarcinoma de cólon (CT26).

De acordo com o desenho experimental acima, os animais foram pré-condicionados durante 45 dias em esteira rolante com 60% da velocidade atingida no teste máximo que realizamos previamente ao período de treinamento e permaneceram se exercitando durante todo o segmento

experimental. Cabe ressaltar que esse protocolo de treinamento físico foi previamente padronizado em nosso laboratório (Ferreira et al. 2007) e 60% da velocidade atingida no teste máximo de esforço equivale a velocidade de máximo estado estável do lactato, ou seja, é a máxima intensidade de exercício onde o metabolismo aeróbio é predominante para o fornecimento de energia. Importante, o protocolo de exercício foi realizado no período prévio e posterior ao inóculo, pois foi demonstrado na literatura que o exercício realizado apenas no período pós inóculo das células tumorais não é suficiente para desencadear seus efeitos benéficos (Pedersen, 2016).

Para randomização e avaliação da capacidade física dos animais, realizamos teste máximo em esteira rolante 4 dias antes do início da intervenção do TFA e o repetimos antes do inóculo das células tumorais. Como podemos ver na Figura 10, o grupo treinado (TR) atingiu maior capacidade de corrida após o TFA quando comparado aos grupos controles (Controle e SED)

Figura 10. Capacidade aeróbia de camundongos saudáveis após o período do protocolo de TFA. (A) Distância máxima em metros atingida no teste máximo em esteira rolante por camundongos sedentários saudáveis (controle, $n = 10$), sedentários (SED, $n = 15$) e camundongos treinados (TR, $n = 7$). Dados em média $\pm$ erro padrão ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$ indicam diferença significativa. Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância (ANOVA) de um fator com *post-hoc* de *Bonferroni*.

Além disso, também realizamos o exame ecocardiográfico 2 dias antes da intervenção do TFA, pré e 16 dias após a injeção das células tumorais. Após inóculo das células tumorais, foram avaliados diariamente o crescimento tumoral e a massa corporal dos animais, sendo a última utilizada como principal parâmetro de caquexia. Os animais foram sacrificados após o período de 19 dias do inóculo das células tumorais. No momento do sacrifício, os músculos (coração, gastrocnêmio, sóleo e tibial anterior) foram cuidadosamente dissecados, tiveram sua massa aferida e foram imediatamente congelados em freezer -80°C para posteriores análises bioquímicas e histológicas. Também foram coletados pulmão e fígado para calcular a razão massa úmida/seca, que é um índice para averiguar a retenção hídrica nos pulmões e fígado. Por fim, a massa do tecido adiposo epididimal e dos tumores foram aferidas.

Como demonstrado na Figura 11A, houve redução significativa na massa corporal total a partir do nono dia pós injeção das células tumorais no grupo CT26 SED quando comparados ao controle. No entanto, notamos essa diferença desde o segundo dia de injeção das células tumorais no grupo CT26 TR quando comparados ao grupo controle e CT26 SED. Muito possivelmente, essa resposta ocorra devido ao efeito estressor do TFA na redução de massa corporal e somado ao efeito do câncer. A partir do décimo dia, as diferenças de massa corporal passam a ser dos dois grupos experimentais CT26 SED e CT26 TR em relação ao controle. Portanto, o TFA não foi capaz de atenuar a perda de massa corporal na caquexia do câncer no modelo CT26. O mesmo resultado é reforçado quando a massa corporal é calculada na ausência da massa tumoral (Figura 11B). Da mesma forma, o TFA não foi eficaz em atenuar a perda de massa muscular esquelética no grupo CT26 TR como observamos na Figura 11D, E e F.

Importante, demonstramos o efeito do TFA em reduzir o volume tumoral do grupo CT26 TR quando comparado ao grupo CT26 SED (Figura 11C). Esse dado corrobora dados anteriores do nosso laboratório e reforça os resultados de estudos na literatura que apontam o exercício físico como importante terapia para redução do volume tumoral.

Figura 11. Efeito do treinamento físico aeróbio na massa corporal, musculatura esquelética e volume tumoral de camundongos saudáveis e injetados com CT26 sedentários e treinados. (A) Variação da massa corporal total em gramas (g) durante 17 dias após inóculo de células tumorais de carcinoma de cólon; **(B)** Massa corporal final livre da massa tumoral (g). **(C)** Volume tumoral; **(D-F)**. Massa dos músculos esqueléticos sóleo, tibial anterior e gastrocnêmio em mg/comprimento da tibia (mm) de camundongos sedentários saudáveis (controle, n=10), sedentários inoculados com CT26 (CT26 SED, n=15) e camundongos treinados e injetados com CT26 (CT26 TR, n=7). Dados em média $\pm$ erro padrão. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ indicam diferença significativa usando análise de variância (ANOVA) para dados com um fator seguido de *post-hoc* de *Bonferroni*. Para os dados da variação da massa corporal total (A) foi utilizada análise de variância (ANOVA) para dados com

dois fatores com post-hoc de Bonferroni. *vs Control; #vs CT26 SED. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,0001$ indicam diferença significativa.

Em relação às alterações em outros órgãos como fígado, baço e pulmão, o TFA foi eficaz em atenuar a perda de gordura epididimal em camundongos CT26 TR. No baço, o TFA atenuou a esplenomegalia evidente nos camundongos CT26 SED e no pulmão encontramos uma menor relação massa úmida/seca nos camundongos CT26 TR quando comparados aos CT26 SED. Em dados recentes do nosso laboratório (Voltarelli V. et al., 2018- dados não publicados), o TFA foi capaz de atenuar todos os efeitos deletérios do modelo tumoral CT26 como: perda de massa corporal e da musculatura esquelética. Acreditamos que essa diferença ocorreu devido à menor concentração de células tumorais inoculadas (1×10^6) e o período de duração do inóculo (13 dias), caracterizando um modelo experimental menos agressivo. Neste sentido, em conjunto esses resultados sugerem que o TFA pode ser mais eficaz quando submetido às condições não tão severas da doença.

Tabela 2. Massa de diferentes órgãos alterados em decorrência da caquexia do câncer

	Controle (n=10)	CT26 SED (n = 15)	CT26 TR (n = 7)
Gordura epididimal (mg/mm)	9,64 ± 2,70	0,56 ± 0,92*	0,93 ± 1,04*#
Baço (mg/mm)	8,25 ± 2,97	81,08 ± 16,44*	56,77 ± 10,16*#
Fígado (úmida/seca)	3,39 ± 0,10	4,19 ± 0,13*	4,04 ± 0,16*
Pulmão (úmida/seca)	6.50 ± 1,54	7,65 ± 1,42	4,98 ± 0,21#

Gordura epididimal (mg/mm); Baço (mg/mm), Fígado (úmida/seca); Pulmão (úmida/seca). Dados expressos em média e erro padrão. * $p < 0,05$ para diferença dirença significativa. *vs. Controle; # vs. CT26 SED. Dados expressos comparados entre os grupos pela análise de variância (ANOVA) para dados com um fator com *post-hoc* de Bonferroni e teste *t* de *Student* para dados não pareados.

Na Figura 12 A está o painel esquemático do período experimental para as análises referentes ao tecido cardíaco. No coração, o TFA não foi eficaz em atenuar a perda da massa cardíaca presente no grupo CT26 SED (Figura 12B). Corroborando os dados de massa cardíaca, houve diminuição do diâmetro de cardiomiócitos no grupo CT26 SED em comparação ao controle (Figura 12C), sendo que não foi observada a mesma diferença significativa no grupo CT26 TR em relação ao grupo Controle. Assim, o TFA foi eficaz em restabelecer os diâmetros no grupo CT26 TR ao nível do grupo Controle.

No exame ecocardiográfico, observamos diminuição significativa da fração de ejeção no músculo cardíaco dos animais CT26 SED (Tabela 3), sendo que a mesma redução não foi observada no grupo CT26 TR. Para as medidas de diâmetro e espessura, observamos aumento significativo apenas

na espessura do septo interventricular e parede posterior do VE na diástole no grupo CT26 TR como resposta ao TFA 16 dias após inóculo das células tumorais (Tabela 3).

Figura 12. Efeito do treinamento físico aeróbico na massa cardíaca e diâmetro de cardiomiócitos.

(A) Painel esquemático ilustrando o desenho experimental para as medidas cardíacas. (B) Massa cardíaca (mg/mm) (C) Diâmetro dos cardiomiócitos de camundongos controle (Controle = 10); sedentários inoculados com células tumorais de

carcinoma de cólon (CT26 SED n=15) e treinados inoculados com CT26 (CT26 TR n=7) 19 dias após inóculo de células CT26. Dados em média e erro padrão. * $p < 0,05$ para diferença significativa usando análise de variância (ANOVA) para dados com um fator com *post-hoc* de *Bonferroni* e teste *t* de *Student* para dados não pareados.

Tabela.3 Parâmetros ecocardiográficos do modelo experimental CT26: efeitos do TFA.

	16 dias após inóculo das células CT26		
Variáveis	Controle (n = 10)	CT26 SED (n=15)	CT26 TR (n=7)
DVED (mm)	3,90± 0,37	3,94 ± 0,51	3,68 ± 0,25
DVES (mm)	2,51 ± 0,45	2,54 ± 0,50	2,45 ± 0,38
SIVD (mm)	0,61 ± 0,08	0,59 ± 0,10	0,72 ± 0,17#
SIVS (mm)	0,88 ± 0,12	0,98 ± 0,17	1,06 ± 0,21
DPVED (mm)	0,63 ± 0,08	0,63 ± 0,12	0,75 ± 0,09*#
DPVES (mm)	1,00 ± 0,14	1,09 ± 0,14	1,06 ± 0,24
FE (%)	68,7 ± 5,8	58,1 ± 8,3*	62,2 ± 11,4
FC (bpm)	412 ± 29,7	420 ± 94,2	416 ± 32,0

DVED, diâmetro do ventrículo esquerdo na diástole; DVES, diâmetro do ventrículo esquerdo na sístole; SIVD, septo interventricular na diástole; SIVS, septo interventricular na sístole; DPVED, diâmetro da parede posterior do ventrículo esquerdo na diástole; DPVES, diâmetro da parede posterior do ventrículo esquerdo na sístole (mm). FE, fração de ejeção FC, frequência cardíaca. Dados em média e erro padrão. *p<0,05 para diferença significativa *vs Controle; # vs CT26 SED. Dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de um fator (ANOVA) com *post-hoc* de *Bonferroni*.

No intuito de compreender melhor nossos resultados funcionais e estruturais cardíacos no modelo CT26, buscamos analisar as possíveis mudanças na estrutura do tecido cardíaco. Para tal, investigamos o conteúdo de colágeno presente na porção intersticial do tecido cardíaco. As análises foram coletadas em tecidos corados por *Picrosirius-Red*, capaz de distinguir as fibras de colágeno presente no corte histológico cardíaco se analisado em microscópio com luz polarizada. Como podemos observar na Figura 13, o conteúdo de colágeno total (Figura 13A), colágeno do tipo I (Figura 13B) e tipo III (Figura 13C) estão aumentados no coração de camundongos com caquexia do câncer. Além disso, observamos como efeito benéfico do TFA uma tendência de $p=0,07$ em atenuar o conteúdo de colágeno do tipo I (Figura 13B) e diminuição significativa do acúmulo de colágeno do tipo III (Figura 13C).

Figura 13. Efeito do TFA no conteúdo intersticial de colágeno cardíaco.

(A) Percentual de colágeno total cardíaco pela área total do tecido (μm); **(B)** Percentual de colágeno tipo I pela área total de tecido (μm); **(C)** Percentual de colágeno tipo III pela área total de tecido (μm); **(D)** Imagens representativas do conteúdo total de

colágeno, aumento 40x, barra da escala = 500 μ m. Grupos controle saudável (Controle, n=4), sedentários inoculados com células tumorais de carcinoma de cólon (CT26 SED n=5) e treinados inoculados com CT26 (CT26 TR n=3) Coloração dos cortes histológicos por *Picrosirius – red*. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão. * $p<0,05$; *** $p<0,001$ e **** $p<0,0001$ indicam diferença significativa usando análise de variância (ANOVA) de um fator e *post-hoc* de *Bonferroni*.

Corroborando os resultados de fibrose intersticial presente no tecido cardíaco, avaliamos de forma semi-quantitativa, o percentual de inflamação presente no tecido cardíaco. Para essa metodologia, nos baseamos na descrição de Ciháková et al., 2004 (Ciháková et al., 2004) que avaliou a porcentagem de células mononucleares infiltrantes no miocárdio em secções histológicas em avaliação microscópica, estabelecendo a seguinte classificação: grau 0, ausência de inflamação; grau 1, <10% da secção do coração está infiltrada; grau 2, 10-30%; grau 3, 30 a 50%; grau 4, 50-90%; e grau 5, > 90% (Ciháková et al., 2004). Utilizando o software ImageJ versão 7, circundamos a área com a presença de infiltrados localizados nas cicatrizes do tecido cardíaco (Figura 14A). Em seguida, quantificamos o percentual da área circundada em relação à área total e classificamos o escore de inflamação de acordo com os graus descritos por Cihaková. Como podemos observar na Figura 14B, houve aumento significativo de células infiltrantes no coração de animais CT26 SED quando comparados ao Controle. Além disso, a classificação do grau de inflamação revelou uma inflamação significativamente mais grave no ventrículo direito no grupo CT26 SED (Figura 14C). Assim, o TFA foi um tratamento eficaz em atenuar a fibrose e inflamação cardíaca em camundongos com caquexia do câncer.

Figura 14. TFA reduz a inflamação cardíaca na caquexia do câncer. Todos os campos microscópicos foram obtidos com aumento de 20x. Barra de escala = 20 µm. **(A)** Imagens representativas mostrando cortes cardíacos corados com hematoxilina e eosina; **(B e C)** Escore de inflamação no ventrículo esquerdo e ventrículo direito, respectivamente, de camundongos Controle (n = 4), CT26 SED (n = 5) e CT26 TR (n = 4). Dados apresentados como média ± erro padrão. *p<0,05 indica diferença significativa. A significância estatística foi determinada pelo teste de Kruskal-Wallis para dados não paramétricos seguido por teste de múltiplas comparações de Dunn.

6.3 Efeito do treinamento físico aeróbio nas alterações proteicas e gênicas do músculo cardíaco de camundongos do modelo CT26.

Dentre os diferentes tipos de células presentes no tecido cardíaco, a maior população é composta por fibroblastos. Os fibroblastos cardíacos constituem, aproximadamente, dois terços do volume total do coração, além disso, essas células assumem diferentes funções e propriedades, exercendo importante papel no desenvolvimento cardíaco e resposta ao estresse. Estão em seu estado quiescente após o desenvolvimento embrionário, entretanto, em resposta à estímulos, os fibroblastos cardíacos podem se diferenciar em miofibroblastos que são células com grande capacidade de sintetizar proteínas da matriz extracelular. Essas células são altamente responsivas às citocinas liberadas em algum tipo de lesão ao tecido cardíaco, como também são responsáveis pela produção e secreção de algumas citocinas que mantêm a resposta inflamatória no local da lesão (Fan et al., 2012; Wu et al., 2018).

A diferenciação de fibroblastos cardíacos em miofibroblastos é promovida por TGF- β , citocinas e outros fatores de crescimento. Diversos trabalhos demonstraram que a transição da inflamação aguda para formação de tecido fibrótico é mediada por TGF- β e o remodelamento progressivo do miocárdio está associado a altos níveis desse fator de crescimento (Dobaczewski et al., 2011; Euler-Taimor and Heger, 2006). Portanto, nosso próximo passo foi o de avaliar a expressão dos níveis de mRNA de TGF- β 1. Na Figura 15A, o gráfico descreve o aumento dos níveis de mRNA de TGF- β 1 no grupo CT26 SED comparado ao grupo Controle, o mesmo não ocorre para o grupo CT26 TR. Em constraste, os níveis de mRNA de Smad2 estão diminuídos no coração dos animais com tumor (Figura 15B e D). Não houve diferença significativa para a expressão gênica de Smad3 (Figura 15C). Relacionado ao metabolismo oxidativo, os níveis de SDHA estão diminuídos no câncer o que irá corroborar os próximos resultados de alterações proteicas mitocondriais presentes no coração dos animais com caquexia do câncer. Por fim, não encontramos diferenças significantes na expressão de ANP e BNP.

Figura 15. Níveis de mRNA de genes relacionados ao remodelamento cardíaco e inflamação no coração de camundongos CT26 com tumor. (A-D) análise por qPCR de TGF- β 1, Smad2; Smad3 e Smad2/3; (E) Succinato desidrogenase A (SDHA); (F e G) ANP e BNP nos corações de camundongos Controle, CT26 SED e CT26 TR; n = 7 a 10 por grupo. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ indicam diferença significativa. Dados comparados usando análise de variância ANOVA de um fator seguido pelo *pos-hoc* de Bonferroni.

Até o presente momento as alterações cardíacas encontradas em nosso estudo são definidas por fibrose intersticial, inflamação no tecido cardíaco associados à sinalização de TGF- β 1, redução da fração de ejeção e atrofia cardíaca encontrados nos camundongos com carcinoma de cólon CT26. Em conjunto, esses resultados nortearam nossa busca em relação aos efeitos do câncer na dinâmica energética do tecido cardíaco, considerando especificamente a redução dos níveis de mRNA de SDHA. Essas alterações são sugestivas de prejuízo na geração de energia da célula cardíaca, para tal, investigamos os níveis proteicos de complexos mitocondriais (Figura 16) e o consumo de oxigênio das células cardíacas quantificadas por oxígrafo (Figura 17).

Podemos observar na Figura 16A que os níveis proteicos do complexo mitocondrial IV (MTCOI) no coração está significativamente diminuído em comparação aos níveis do grupo controle, sendo que o TFA foi eficaz em

atenuar essa diminuição quando comparado aos níveis proteicos do grupo CT26 SED (Figura 16 A). Em contraste à diminuição da expressão gênica de SDHA, para os níveis proteicos do complexo II (SDHB) não encontramos diferença significativa no grupo CT26 SED em relação ao grupo controle, entretanto, houve uma tendência de aumento nos níveis proteicos do grupo CT26 TR quando comparado ao grupo CT26 SED (Figura 16B). Não encontramos alterações significantes para os níveis proteicos dos complexos mitocondriais I e V (Figura 16 C e D).

Figura 16. Alteração do conteúdo proteico de complexos mitocondriais do músculo cardíaco de camundongos do modelo CT26. (A) Conteúdo

proteico complexo mitocondrial IV; (B) Complexo mitocondrial II; **(C)** Complexo Mitocondrial I; **(D)** Complexo Mitocondrial V; **(E)** Imagem da membrana de western blotting e os complexos mitocondriais analisados. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ indicam diferença significativa. Dados comparados usando análise de variância (ANOVA) para dados com um fator seguidos de *post-hoc* de *Bonferroni*.

Para verificar a função das mitocôndrias do músculo cardíaco do modelo CT26, isolamos mitocôndrias cardíacas em todos os grupos estudados e realizamos o ensaio de função mitocondrial em oxígrafo com a adição de substratos ADP, bloqueio do complexo ATP-ase e estimulação da respiração mitocondrial máxima com FCCP, para mimetizar o consumo de oxigênio das mitocôndrias cardíacas. Como podemos observar na Figura 17 (A-D), não encontramos diferenças significantes nas nossas análises. No entanto, acreditamos que o número amostral ainda não seja suficiente para essa análise, considerando a sensibilidade do ensaio e as variações durante o processo de extração das mitocôndrias cardíacas. Os ensaios foram repetidos e padronizamos as concentrações da fração mitocondrial e qualidade das mitocôndrias extraídas para realizá-lo, no entanto, para uma resposta consistente é necessário um número amostral maior.

Figura 17. Respiração mitocondrial da fração cardíaca do modelo CT26.

(A) Respiração basal, estado basal expresso em pmol/min/mg de tecido cardíaco; **(B)** Estímulo da respiração mitocondrial por ADP; **(C)** Bloqueio do complexo ATP-ase por Oligomicina; **(D)** Estimulação da respiração máxima por FCCP em mitocôndrias extraídas do tecido cardíaco de camundongos controle (SED), injetados com células tumorais CT26 sedentários e treinados (CT26 SED) e (CT26 TR). Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão. * $p < 0,05$ indica diferença significativa usando análise de variância (ANOVA) para dados com um fator com *post-hoc* de *Bonferroni*.

Um resumo dos principais resultados obtidos no nosso estudo estão apresentados na Figura 18.

A)

B)

Figura 18. Resumo gráfico dos resultados do estudo. A) Efeitos da caquexia do câncer (em vermelho e à esquerda) na via de TGF- β , fibrose e inflamação e os efeitos do TFA (em azul e à direita). Abaixo, complexos mitocondriais e indicação dos efeitos da caquexia do câncer (seta vermelha) e do TFA (seta azul). À direita, quadro com resumo com os resultados.

7 DISCUSSÃO

As alterações cardíacas que se manifestam no câncer têm recebido muita atenção nos últimos anos. No geral, o principal foco das pesquisas é o de investigar os danos cardíacos (efeitos cardiotoxícos) causados por terapias antineoplásicas. No entanto, evidências na literatura já amparam a ocorrência de um remodelamento cardíaco patológico em pacientes com câncer previamente ao tratamento (Pavo et al., 2015). Sabendo dos efeitos benéficos do exercício físico, esse estudo teve como objetivo identificar se haveria dano no tecido cardíaco em decorrência da caquexia do câncer no modelo experimental CT26; e quais as possíveis alterações moleculares e celulares envolvidas nas alterações cardíacas.

Inicialmente, sabendo que modelos experimentais de caquexia do câncer induzem alterações cardíacas (Mishra et al., 2018; Schäfer et al., 2016; Springer et al., 2014), e com o intuito de confirmar se essas alterações estariam presentes no modelo experimental proposto, iniciamos esse estudo caracterizando o fenótipo dos animais 19 dias após a injeção de células tumorais CT26. Para isso, avaliamos a presença de caquexia e se a mesma seria acompanhada por alterações em parâmetros morfofuncionais cardíacos nos grupos estudados.

O período de inoculação das células tumorais CT26 foi determinado de acordo com a literatura e após caracterização da perda de massa corporal, muscular esquelética e adiposa nos animais com tumor. De fato, nosso modelo experimental CT26 foi eficaz em induzir perda de massa corporal, gordura epididimal, massa cardíaca e massa dos músculos esqueléticos tibial anterior, sóleo e gastrocnêmio. A inflamação sistêmica presente exerce importante na caquexia e influencia na dinâmica de diversos tecidos. Portanto, também verificamos esplenomegalia, edema pulmonar e o aumento da massa do fígado nos camundongos com tumor. Essas alterações estão relacionadas ao estado de inflamação e desequilíbrio metabólico gerados pela síndrome, e órgãos com importante função no sistema imune são diretamente afetados resultando em mudanças na suas massas, e muito provavelmente, em suas funções.

Em 2009, Swirski et al., identificaram no baço um reservatório de monócitos que migraram através do sangue para locais com lesão como ocorre no infarto do miocárdio. Neste estudo, os pesquisadores identificaram uma população de monócitos residentes no baço em regiões específicas (“subcapsular *red pulp*”) mostrando a função de reservatório de monócitos. Para compreender a função dessas células, os pesquisadores utilizaram um modelo animal de infarto do miocárdio por ligadura da artéria coronária descendente esquerda. Um dia após o procedimento, observaram diminuição de monócitos na região subcapsular do baço “*red pulp*”; o aumento dessas células no sangue e infiltrantes no tecido cardíaco lesionado (Swirski et al., 2009). Portanto, a lesão causada no coração gerou uma resposta inflamatória identificada no baço que libera monócitos, que por sua vez, infiltram no tecido lesionado, sugerindo que o baço exerce importante função como sistema de defesa do organismo, e pode direcionar células para tecidos que necessitam de uma resposta imune. Assim, podemos considerar que o baço exerce maior atividade na produção de células do sistema imune e hematológicas no câncer.

A avaliação da função e estrutura cardíacas foi realizada por meio de exame ecocardiográfico 16 dias após o inóculo das células tumorais. Como observado nos resultados, houve redução da fração de ejeção e encurtamento nesse período indicando disfunção ventricular esquerda nos camundongos com tumor, acompanhada de atrofia cardíaca e redução do diâmetro de cardiomiócitos. A utilização do ecocardiograma é recomendada para identificação de anormalidades no funcionamento cardíaco tanto em humanos como em roedores.

A disfunção ventricular identificada nos camundongos com tumor está associada à inflamação sistêmica presente em nosso modelo experimental. Além disso, o estresse metabólico, tecidual e sistêmico na caquexia podem gerar sobrecarga hemodinâmica cardíaca na qual o músculo cardíaco responde às perturbações externas na tentativa de compensar prejuízos fisiológicos gerados pelo tumor (Argilés et al., 2014). As alterações de massa do pulmão, baço e fígado representam a instabilidade fisiológica do organismo e contribuem para necessidade de maior trabalho cardíaco para suprir as demandas dos tecidos. Além disso, vale reforçar que o fígado é um órgão de

grande importância para o sistema imune e um importante órgão metabólico. Assim como o baço, houve aumento significativo da massa do fígado nos animais com tumor, sendo que um dos fatores que contribuem para esse aumento é a resposta imune exacerbada na fase de reação do organismo. Já o aumento da massa do pulmão e o acúmulo de líquido caracterizando o edema pulmonar acompanham a progressão da disfunção ventricular devido à incapacidade do ventrículo esquerdo em bombear quantidades adequadas de sangue (Figuerola e Peters, 2003). Portanto, nossos dados sugerem que os animais SED CT26 apresentam caquexia do câncer e associada à disfunção cardíaca avançada com presença de edema pulmonar.

Após a caracterização do modelo experimental CT26, exploramos o efeito benéfico do TFA e possíveis mecanismos. O exercício físico tem sido relatado como uma ferramenta viável para prevenção e terapia em cardiologia (Medeiros et al., 2008; Oliveira et al., 2009), e estudos ainda incipientes também especulam sobre seu papel potencial contra os efeitos adversos do câncer (Antunes et al., 2018). Em nossos dados, demonstramos o impacto do TFA no modelo experimental CT26. Primeiramente, avaliamos a capacidade aeróbia dos camundongos através do teste de esforço máximo em esteira rolante, e de fato, os camundongos treinados apresentam maior capacidade de corrida, confirmando que o protocolo proposto foi eficaz para promoção da capacidade física. Assim, após 45 dias de treinamento, camundongos foram injetados com células tumorais CT26 e divididos nos grupos CT26 SED e CT26 TR.

Nossos resultados demonstraram a redução do volume tumoral no modelo CT26 nos animais treinados. Esse resultado evidencia o importante papel do TFA e corrobora outros estudos que usaram outros modelos de câncer (Padrão et al., 2015; Pedersen et al., 2016). Apesar da redução do volume tumoral, o TFA não foi eficaz em atenuar a perda de massa corporal nos camundongos com tumor. Por outro lado, o TFA foi eficaz na redução da massa do baço e menor perda de gordura epididimal sugerindo melhores adaptações do organismo frente às complicações do câncer, o que é extremamente relevante considerado o quadro já avançado de caquexia e disfunção cardíaca do modelo estudado.

A disfunção cardíaca na caquexia do câncer parece estar principalmente associada à remodelação cardíaca perda de massa cardíaca em estágios avançados da síndrome (Baskin e Taegtmeyer, 2011). Nossos dados, demonstram que os animais com tumor CT26 possuem atrofia cardíaca associada ao menor diâmetro da área de secção transversal do cardiomiócito. Em conjunto, essas alterações levam à disfunção cardíaca observada no presente estudo pela redução da fração de ejeção do ventrículo esquerdo em camundongos com tumor CT26, corroborando dados de outros estudos sobre câncer (Springer et al., 2014; Tian et al., 2011). No entanto, o protocolo de TFA não foi eficaz em atenuar a disfunção e atrofia cardíacas em camundongos com tumor CT26. Esse resultado não surpreende se levarmos em consideração o estágio avançado da caquexia e disfunção cardíaca associada a edema. No entanto, o TFA conseguiu atenuar outros efeitos cardíacos da caquexia no nosso modelo. Em outro estudo, ratos com carcinoma urotelial, possuem atrofia de cardiomiócitos (Padrão et al., 2018) e o TFA oferecido nesse estudo foi suficiente para atenuar a atrofia nos animais com tumor. Vale ressaltar que o modelo de câncer utilizado neste estudo não era tão grave, considerando que não houve perda de massa muscular e massa cardíaca, como o nosso modelo experimental. Além disso, trabalho do nosso laboratório demonstra que em menor quantidade de células tumorais CT26 e menor período de tempo para o crescimento tumoral, o TFA é eficaz em atenuar a perda de massa corporal e muscular esquelética. Dessa forma, em modelos experimentais menos agressivos é esperado maior efeito do TFA. No entanto, os mecanismos moleculares relacionados a essa resposta são desconhecidos. Vale ressaltar que nosso estudo é o primeiro a avaliar o efeito da TFA na função cardíaca em um modelo de caquexia do câncer.

Observamos acúmulo de colágeno e inflamação cardíaca associados às alterações de massa e função cardíacas. Amplamente relatada, a fibrose cardíaca resulta na rigidez do miocárdio e consequentemente, reduz a complacência, assim está associada ao mau prognóstico em doenças cardiovasculares (Suthahar et al., 2017). No cenário do câncer, demonstramos que camundongos CT26 SED apresentam fibrose cardíaca caracterizada por deposição de colágeno, semelhante ao que foi relatado por Padrão et al.,

(Padrão et al., 2015, 2018). Além disso, mostramos o aumento específico do colágeno tipos I e III, que são os principais componentes da matriz extracelular cardíaca (Wang et al., 2002). Buscando melhor compreensão do remodelamento da matrix extracelular cardíaca, investigamos se sinais de inflamação também estariam presentes no tecidos cardíacos dos camundongos com tumor, e posteriormente, avaliamos o papel do TFA nessa alteração.

Realizamos uma análise semi-quantitativa dos cortes histológicos cardíacos buscando região com infiltrados inflamatórios. Para isso, notando uma aparente diferença da área de inflamação entre os ventrículos direito e esquerdo, realizamos as análises de inflamação levando em consideração a câmara cardíaca. De fato, a quantificação da inflamação foi mais evidente no ventrículo direito. A classificação da inflamação cardíaca representa a interação entre fibrose cardíaca e inflamação, a qual é uma característica comum do remodelamento cardíaco patológico. Por sua vez, o TFA diminuiu significativamente a inflamação cardíaca presente nos camundongos CT26 TR que pode ser associada aos menores níveis de fibrose também presentes nesses animais.

Após essa quantificação e como forma de elucidar possíveis mecanismos moleculares envolvidos nas respostas patológicas de remodelamento do tecido cardíaco nos animais com tumor, analisamos os níveis de mRNA de TGF- β 1, conhecido pelo seu amplo papel no remodelamento cardíaco por promover fibrose intersticial (Khalil et al., 2017; Mishra et al., 2018). De fato, os resultados mostram aumento nos níveis de mRNA de TGF- β 1 em camundongos com tumor, sendo esse aumento atenuado pelo TFA nos camundongos do grupo CT26 TR. O aumento dos níveis de TGF- β 1 corroboram os estudos que relatam remodelamento cardíaco associado à resposta fibrótica (Khalil et al., 2017).

O papel da via TGF- β é bem conhecido por ativar a sinalização de Smad nos fibroblastos cardíacos, mediando assim a produção de colágeno pela ativação e recrutamento dos fibroblastos. A via canônica de TGF- β é caracterizada pela mobilização das Smads regulatórias, a saber Smad2 e Smad3, as quais controlam o processo de fibrose induzindo a expressão de genes específicos. A cascata dessa via se inicia quando TGF- β se liga ao seu receptor localizado no

membrana plasmática, TGF- β 1 e TGF- β 2 e induzem a fosforilação das Smad2 e Smad3. Quando fosforiladas, essas Smads interagem com Smad4 localizada no citoplasma da célula, o que desencadeia a translocação em conjunto desses fatores para o compartimento nuclear promovendo a transcrição gênica (Derynck and Zhang, 2003). Dessa forma, avaliamos os níveis de mRNA de Smad2 e Smad3 na tentativa de melhor compreensão da cascata de sinalização da via de TGF- β . Nossos resultados mostram que os altos níveis de mRNA de TGF- β 1 encontrados no coração dos camundongos CT26 SED não é acompanhado aumento de expressão de Smad2 e Smad3. Pelo contrário, encontramos a redução significativa de Smad2 nos camundongos com tumor. Não foram encontradas diferenças entre os níveis de mRNA de Smad3 no coração dos camundongos. Portanto, os níveis elevados de fibrose e TGF- β 1 no coração de camundongos com tumor do grupo CT26 SED não foram acompanhados aumentos de mRNA de Smad3 e Smad2, sugerindo uma sinalização diferente da que já é bem descrita nas doenças cardíacas (Khalil et al., 2017). Assim, há necessidade de uma análise pós-transcricional na intenção de confirmar os níveis de Smad2 fosforilados. Além disso, outros fatores podem influenciar as Smads. Existe uma grande variedade de outros fatores transcricionais do citoplasma e receptores que interagem com Smad2 e influenciam em seu papel. Como dito anteriormente, sinalização das Smad's pode ser de forma dependente ou independente da ativação de TGF- β 1, como exemplo, a sinalização intracelular de Smad2 e Smad3 também pode ocorrer via ativação do receptor de activina (ActRII ou ActRIIB), desencadeando respostas dependentes da ativação específica desse receptor que geram alterações nos níveis de Smads. Assim, a regulação dos níveis de Smad's podem ser influenciados, não apenas por TGF- β , como também por outras vias. Da mesma forma, as Smad2 e Smad3 também podem ser reguladas negativamente por Smad7 e por enzimas de E3 de ubiquitinação (Smurfs) (Ézar and Ilho, 2007; Fearon et al., 2012). Portanto, os níveis das Smad2 e Smad3 podem ser influenciados por diferentes ligantes, por interações com outras proteínas intracelulares e outras vias de sinalização. Vale considerar, que não há na literatura nenhum dado mostrando o papel de TGF- β 1 e Smads no coração e na caquexia do câncer.

Assim, em conjunto esses dados oferecem novas perspectivas para estudo. Concluindo, sugerimos que o TFA foi de fato uma intervenção eficaz em atenuar a fibrose associada à inflamação cardíaca em camundongos com tumor CT26, e que essa resposta pode ser mediada por TGF- β 1.

A fisiopatologia da disfunção e remodelamento do miocárdio está associada ao comprometimento do suprimento de oxigênio para esse tecido. Assim, não é de surpreender que o remodelamento cardíaco patológico esteja associado à disfunção mitocondrial (Ingwall, 2009; Seddon et al., 2007). Além disso, o processo de alteração da matriz extracelular envolve a rápida proliferação de fibroblastos em resposta às alterações metabólicas (Fan et al., 2012).

Em nosso estudo, avaliamos os níveis proteicos de complexos mitocondriais para compreensão de mecanismos que envolvem a maquinaria energética do cardiomiócito e que pudessem influenciar o processo de remodelamento cardíaco. Nossos resultados mostram níveis significativamente reduzidos de proteínas do complexo mitocondrial IV (subunidade da citocromo c oxidase 1); complexo mitocondrial II e níveis mRNA de SDHA (succinato desidrogenase; subunidade complexo II) no tecido cardíaco de camundongos com tumor. O TFA foi eficaz em atenuar significativamente a redução apenas dos níveis do complexo IV, e tendência de aumento dos níveis proteicos do complexo mitocondrial II em camundongos CT26 TR em comparação aos camundongos CT26 SED.

No geral, essas alterações podem explicar as anormalidade funcionais e morfológicas encontradas no miocárdio dos animais com tumor. Vale lembrar que a mitocôndria é a maior fonte de espécies reativas ao oxigênio, e somado ao processo de inflamação, anormalidades na geração de energia podem aumentar o estresse oxidativo. Por sua vez, a contrarregulação do TFA contribui para melhora da capacidade oxidativa das células cardíacas, protegendo o coração e justificando parcialmente o menor conteúdo fibrótico e inflamação presente nos camundongos com tumor e treinados.

De fato, o TFA já é conhecido por melhorar a capacidade respiratória mitocondrial, e conseqüentemente, auxiliar na proteção do tecido cardíaco

(Campos et al., 2017). Além disso, devido à sua posição estratégica na cadeia de transporte de elétrons, o complexo IV mantém rígido controle sobre o fluxo da cadeia da fosforilação oxidativa e a produção de ATP (Fukuda et al., 2007; Helling et al., 2012; Huttemann et al., 2012; Semenza, 2011). Assim, uma vez que os níveis proteicos desses complexos mitocondriais estão diminuídos, danos são observados no aparato mitocondrial e na produção de energia por uma célula que demanda constante produção de ATP para realizar suas funções. Além disso, o escape de elétrons e a geração de espécies reativas pode ser maior e, portanto, sugere que o músculo cardíaco esteja com menor poder de contração e maior estresse oxidativo. Assim, sugere-se que esse desequilíbrio oxidativo na célula favoreça um ambiente para a inflamação e fibrose cardíacas. Dessa forma, associamos esse déficit energético caracterizado pela redução dos níveis proteicos do complexo IV à menor fração de ejeção e ao remodelamento cardíaco encontrado nos camundongos com tumor CT26. Importante, nossos dados não foram suficientes para demonstrar diminuição da função mitocondrial nos camundongos com tumor avaliados por oxígrafo devido ao tamanho de nossa amostra, caracterizando uma limitação desse estudo com os dados que conseguimos coletar para a dissertação.

A questão que envolve a bioenergética mitocondrial e metabolismo oxidativo cardíaco é de grande importância dada a demanda contínua por altos níveis de ATP pelos cardiomiócitos para contração do tecido. Quando essa demanda não é atendida, há um prejuízo no trabalho cardíaco, e em geral, esse prejuízo na produção de energia envolve todo o aparato para sua geração. A capacidade de gerar ATP de acordo com a demanda da célula é conhecida como capacidade respiratória de reserva e é primordial para sobrevivência celular. Associadas à disfunção mitocondrial, anormalidades no metabolismo de carboidratos e lipídios no tecido cardíaco compõem a base para elevação da capacidade respiratória de reserva.

Em conjunto, essas alterações envolvem o Ciclo de Krebs e a cadeia de transporte de elétrons, conseqüentemente, influenciam negativamente a capacidade respiratória reserva das células podendo conduzi-la à morte celular. Importante, a succinato desidrogenase é a única enzima que atua em ambos, na utilização de substratos energéticos e transporte de elétrons

(Dhingra and Kirshenbaum, 2015). Assim, avaliamos os níveis de mRNA de SDHA com o objetivo de confirmar prejuízos no complexo II mitocondrial cardíaco em decorrência do câncer. Nossos resultados mostram a diminuição de mRNA SDHA no grupo CT26 SED evidenciando o prejuízo causado à célula cardíaca em decorrência da caquexia do câncer. No entanto, o TFA não foi eficaz em alterar essa diminuição. Esses achados reforçam a disfunção mitocondrial presente no tecido cardíaco de animais com tumor encontrado em outros estudos (Drott and Lundholm, 1990; Karlstaedt et al., 2016; Schäfer et al., 2016; Tian et al., 2011). Ainda, já é conhecido que fatores induzidos pelo tumor, “oncometabólitos” ou “caquexoquinas” atuam modificando o metabolismo energético do tecido cardíaco, prejudicando a função desse tecido (Karlstaedt et al., 2016; Schäfer et al., 2016). Por fim, destacamos a importância da regulação do metabolismo energético para a função do tecido cardíaco e evidenciamos o papel do TFA nessa regulação.

Novos estudos devem explorar se protocolos de treinamento físico mais prolongados conduzem à efeitos benéficos mais abrangentes resultando em maior redução ou prevenção da disfunção cardíaca na caquexia do câncer. Além disso, nossos dados reforçam a importância de identificar o coração como um importante alvo terapêutico na caquexia do câncer, uma vez que as alterações cardíacas estão presentes independentes das terapias antitumorais.

8 CONCLUSÃO

Nossos resultados demonstram que animais injetados com células tumorais CT26 apresentaram atrofia cardíaca, acúmulo de colágeno intersticial e inflamação no tecido cardíaco. Adicionalmente, o remodelamento cardíaco presente nesses animais pode ser associado às alterações dos níveis cardíacos de mRNA de TGF- β 1 e Smad2, assim como, ao prejuízo do metabolismo oxidativo caracterizado por alterações dos níveis proteicos e gênicos de componentes do complexo mitocondrial.

O protocolo de TFA não atenuou a atrofia cardíaca e disfunção cardíaca do ventrículo esquerdo nos animais com tumor, mas foi eficaz na redução da fibrose e inflamação cardíacas decorrentes da caquexia do câncer. Além disso, o TFA atenuou a redução dos níveis do complexo IV e níveis gênicos de TGF- β 1 ambos associados ao processo de remodelamento cardíaco. Dessa forma, esses achados direcionam nosso estudo para melhor compreensão de mecanismos moleculares envolvidos na disfunção cardíaca na caquexia do câncer.

Importante destacar, a redução do volume tumoral nos animais com tumor em resposta ao TFA. De modo geral e como efeito secundário, esse resultado sugere importante papel do exercício físico em atenuar os prejuízos sistêmicos decorrentes da caquexia do câncer.

Por fim, nossos resultados fornecem subsídios para a compreensão dos diferentes efeitos e mecanismos que comprovam a eficácia do TFA em proteger o tecido cardíaco dos efeitos deletérios da caquexia do câncer.

9 ANEXOS

9.1 ANEXO A -Submissão de artigo original

Manuscript Number:	LFS-D-19-04875
Article Type:	Full length article
Keywords:	Aerobic Exercise Training; cancer cachexia; Cardiac Damage; fibrosis; inflammation
Corresponding Author:	Patricia Chakur Brum, Ph.D. University of Sao Paulo SÃO PAULO, SP BRAZIL
First Author:	Larissa Gonçalves Fernandes
Order of Authors:	Larissa Gonçalves Fernandes
	Gabriel Cardial Tobias
	Vanessa Azevedo Volatrelli
	Paulo Magno Martins Dourado
	Patricia Chakur Brum

Exercise training delays cardiac remodeling in mice model of cancer cachexia

Larissa G Fernandes^{1,2}, Gabriel C Tobias², Vanessa A. Voltarelli², Paulo Magno Martins Dourado³, Patricia C Brum^{2*}

¹Department of Experimental Pathophysiology, Medical School, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil.

²School of Physical Education and Sport, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil.

³Heart Institute, Clinical Hospital, Faculty of Medicine, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil.

* Correspondence:

Patricia C. Brum pcbrum@usp.br

Keywords: Aerobic Exercise Training, Cancer Cachexia, Cardiac Damage, Fibrosis, Inflammation

Abstract

Cancer cachexia-induced cardiac damage has become an important issue to survival management and quality of life in cancer patients. Since aerobic exercise training (AET) has been shown to reduce the negative effects of heart failure and other comorbidities in the last

decades, its use as preventive or therapeutic tool has considered a reasonable intervention for cancer-induced cardiac dysfunction. In this study, we aimed to investigate the impact of cancer cachexia and previous AET on cardiac function and structure using a colon adenocarcinoma cells 26 (CT-26) to induce subcutaneous tumor in BALB/c mice. Our data confirms CT-26 tumor-bearing mice as a well-characterized model of cancer cachexia with body-weight loss and skeletal muscle atrophy. CT-26 bearing mice exhibited cardiac atrophy, cardiac dysfunction and remodeling characterized by impaired left ventricle ejection fraction associated with increased cardiac collagen deposition and reduced cardiomyocytes diameter. Indeed, reduced complex IV mitochondrial protein levels, altered mRNA levels of fibrosis and inflammation markers were observed in CT-26 tumor-bearing mice. AET was efficient in attenuating the reduced complex IV mitochondrial protein levels with no impact on left ventricle ejection fraction and cardiac atrophy. Interestingly, AET led to significant anti-cardiac remodeling effect by reducing cardiac collagen deposition and inflammation associated with reduced TGF- β 1 levels and improved oxidative metabolism. Taken together, our study provides evidence for cardiac dysfunction and remodeling in a colon cancer cachexia animal model. The effects of AET in attenuating cardiac fibrosis and inflammation provide mechanistic insights by which AET counteracts cachectic conditions that severely affect the cardiac muscle.

9.2 ANEXO B - Colaborações: artigo original submetido e em preparação

9.2.1 Submetido

Exercise training reduces tumor growth and cancer-induced splenomegaly in multiple cancer models

Gabriel C. Tobias 1 , João L. P. Gomes 1 , Larissa G. Fernandes 1 , Ney R. de Almeida 1 , Paulo R. Jannig 1 , Vanessa A. Voltarelli 1 , Edilamar M. Oliveira 1 , Christiano R. R. Alves 1 , Roger Chammas 2 , Patricia C. Brum 1 *

1 School of Physical Education and Sport, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

2 Department of Radiology and Oncology, School of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

* Correspondence

Patricia C. Brum (pcbrum@usp.br)

Avenida Professor Mello Moraes, 65 - Butantã, 05508-030, Sao Paulo, SP, Brazil.

Tel: +55 11 3091-2149; Fax: +55 11 3813-5921

Running title: Exercise training and cancer-induced splenomegaly

Dear Dr. Fernandes,

Re: JP-RP-2019-278893 "Exercise training reduces tumor growth and cancer-induced splenomegaly in multiple cancer models" by Gabriel Cardial Tobias, João Lucas Penteado Gomes, Larissa Gonçalves Fernandes, Ney Robson de Almeida, Paulo R Jannig, Vanessa Azevedo Voltarelli, Carlos Eduardo Negrão, Edilamar Menezes Oliveira, Christiano Robles Rodrigues Alves, Roger Chammas, and Patricia C Brum

On 31-Aug-2019, the above manuscript was approved online for submission to The Journal of Physiology.

9.2.2 Preparação

Beta2-adrenergic signaling modulates mitochondrial function and dynamics in glycolytic skeletal muscle in response to aerobic exercise.

Vanessa A. Voltarelli; Michael Coronado; Larissa G. Fernades; Juliane C. Campos; Julio C. B. Ferreira; Daniel Bernstein; Patricia C. Brum.

10 ANEXO C - Colaboração em capítulo de livro: CARDIOLOGIA DO EXERCÍCIO - DO ATLETA AO CARDIOPATA. 4ª EDIÇÃO.

3

Sistema musculoesquelético e exercício físico

Marcelo Gomes Pereira
Larissa Gonçalves Fernandes
Janaína da Silva Vieira
Rodrigo Wagner Alves de Souza
Vanessa Azevedo Voltarelli
Patricia Chakur Brum

INTRODUÇÃO

O tecido muscular esquelético contribui com cerca de 60% da massa corporal total de um indivíduo adulto sendo, portanto, o maior órgão do corpo humano.¹ As fibras musculares, formadas durante o desenvolvimento por meio da fusão de células progenitoras miogênicas mononucleadas, são constituídas por aproximadamente 75% de água, 20% de proteínas e 5% de outras substâncias, como vitaminas, minerais e demais íons. Em seu citoplasma (sarcoplasma) também estão os estoques de energia, as moléculas de glicogênio, os triglicerídeos, além de um pequeno suprimento de adenosina trifosfato (ATP).¹

Todas as formas de movimento humano, desde atividades do dia a dia até a execução de gestos esportivos vigorosos, são consideradas eventos bioenergéticos, em que o ATP é a moeda corrente que permite e potencializa as contrações musculares. Devido à importância do ATP para as funções celulares, o organismo dispõe de mecanismos específicos para manter níveis constantes em diferentes demandas energéticas. As diversas atividades esportivas podem ser classificadas em eventos que requerem força/potência, velocidade ou resistência muscular, como o levantamento de pesos, corridas de curtas distâncias (100 m) e maratonas. O sucesso em cada uma dessas atividades depende das reações bioquímicas que contribuem para a ressíntese de ATP colaborando para a manutenção da homeostase da molécula. Em exercícios prolongados, a geração de ATP por vias oxidativas (aeróbias) assume papel de destaque. Para ações rápidas com duração de alguns segundos até poucos minutos, o músculo depende, principalmente, de fontes anaeróbias (metabolismo glicolítico). Já

11 ANEXO D - Congressos

12 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acharyya S, Butchbach ME, Sahenk Z, Wang H, Saque M et al. Dystrophin glycoprotein complex dysfunction: a regulatory link between muscular dystrophy and câncer cachexia. *Cancer Cell*, 8: 421-432, 2005.

Argilés JM, Alvarez B, López-Soriano FJ.(1997). The metabolic Basis of Cancer Cachexia. *Medicinal Research Reviews*, 17: 477-498.

Argilés JM, Busquets S, López-Soriano FJ, et al. (2012). Are there any benefits of exercise training in cancer cachexia? *J CachexiaSarcopenia Muscle*,3: 73-76.

Argilés JM, Busquets S, López-Soriano FJ.(2011). Anti-inflammatory therapies in câncer cachexia.*Eur J Pharmacol*, 668: S81-86.Bal DG, Woolam GL, Seffrin JR. (1999).

Argiles JM, Busquets S, Stemmler B, Lopez-Soriano FJ. Cancer cachexia: understanding the molecular basis. *Nat RevCancer* 2014; 14: 754–762.

AzevedoP. S., PolegatoB. F., Minicucci, M.F, Paiva, S. A. R., . Zornoff,L.A. M .Cardiac Remodeling: Concepts, Clinical Impact, Pathophysiological Mechanisms and Pharmacologic Treatment. *Arq Bras Cardiol*. 2016 Jan; 106(1): 62–69

Booth FW, Roberts CK, Laye MJ. (2012). Lack of exercise is a major cause of chronic disease. *ComprPhysiol*, 2: 1143–211.

Boudina S, Bugger H, Sena S, O'Neill BT, Zaha VG, Ilkun O, Wright JJ, Mazumder PK, Palfreyman E, Tidwell TJ, et al. Contribution of impaired myocardial insulin signaling to mitochondrial dysfunction and oxidative stress in the heart. *Circulation*. 2009; 119:1272–1283.

Boveris AN, Systemic and mitochondrial adaptative response to moderate exercise in rodents.*Free Radical Biology and medicine*.New York, v 44, p. 224-229, 2008.

Bradford MM. (1976).A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.

Budzynski W (1982) Lewis lung carcinoma in mice as an experimental therapy model. I. The growth kinetics and the effect of tumor on host. Arch ImmunolTherExp (Warsz) 30: 363–372.

Busquets S, M T. Figueras, G. F, Almendro V, Moore-Carrasco R, Ametller E, Argiles J., and Lopez-Soriano F. Anticachectic Effects of Formoterol: A Drug for Potential Treatment of Muscle Wasting. CancerResearchGroup, Departament de Bioquí'mica i Biologia Molecular, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain.

Campos JC, Queliconi BB, Dourado PM, Cunha TF, Zambelli VO, Bechara LR, Kowaltowski AJ, Brum PC, Mochly-Rosen D, Ferreira JC. (2012). Exercise training restores cardiac protein quality control in heart failure. Plos One,7(12): e52764. doi:10.1371/journal.pone.0052764.

Christensen HM, Kistorp C, Schou M, Keller N, Zerahn B, Frystyk J, et al. Prevalence of cachexia in chronic heart failure and characteristics of body composition and metabolic status. Endocrine. 2013;43(3):626-34.

Coletti, D., Adamo, S., Moresi, V. How much a mouse is willing to run: having a hard time measuring spontaneous physical activity in different mouse substrains.Eur J Translational Myology. 2017; 27 (1): 67-70 - 1

Coletti, D., Berardi, E., Aulino, P., Rossi, E., Moresi, V., Li, Z., Adamo, S. Substrains of inbred mice differ in their physical activity as a behavior. The Scientific World Journal. 237260. 2013 (2013),

Constantinou C, Fontes de Oliveira CC, Mintzopoulos D, et al. (2011). Nuclear magneticresonance in conjunction with functional genomicssuggests mitochondrial dysfunction in a murine model ofcancer cachexia.Int J Mol Med, 27: 15-24.

Cosper PF, Leinwand LA. Cancer causes cardiac atrophy and autophagy in a sexually dimorphic manner. Cancer Res. 2011;71:1710–20.

Cramer L, Hildebrandt B, Kung T, et al. (2014). Cardiovascular function and predictors of exercise capacity in patients with colorectal cancer. *J Am Coll Cardiol*, 64: 1310-1319.

Das SK, Eder S, Schauer S, et al. (2011). Adipose triglyceride lipase contributes to cancer-associated cachexia. *Science*, 333: 233-238.

Der-Torossian H, Wysong A, Shadfar S, et al. (2013). Metabolic derangements in the gastrocnemius and the effect of Compound A therapy in a murine model of cancer cachexia. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, 4:145-155.

Drott C, Ekman L, Holm S, Waldenström A and Lundholm K: 8. Effects of tumor-load and malnutrition on myocardial function in the isolated working rat heart. *J Mol Cell Cardiol* 18: 1165-1176, 1986.

Eckel R et al., (2014). 2013 AHA/ACC Guidelines on lifestyle management to reduce cardiovascular risk. *Journal of the American College of Cardiology*. Vol. 63, No 25. 2014:2960–84

Egan B, Zierath JR. (2013). Exercise Metabolism and the Molecular Regulation of Skeletal Muscle Adaptation. *Cell Metab*, 17: 162-184.

Fearon KC, Glass DJ, Guttridge DC. (2012). Cancer cachexia: mediators, signaling, and metabolic pathways. *Cell Metab*, 16: 153-166.

Fearon KC, Strasser F, Anker SD, et al. (2011). Definition and classification of cancer cachexia: an international consensus. *Lancet Oncol*, 12: 489-495.

Fearon K, Arends J, Baracos V., (2013). Understanding the mechanisms and treatment options in cancer cachexia. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 10: 90-99.

Fermoselle C, García-Arúmí E, Puig-Vilanova E, et al. (2013). Mitochondrial dysfunction and therapeutic approaches in respiratory and limb muscles of cancer cachectic mice. *Exp Physiol*, 98: 1349-1365.

Ferreira, J. C., Rolim, N. P., Bartholomeu, J. B., Gobatto, C. A., Kokubun E. e Brum, P. C. Maximal lactate steady state in running mice: effect of exercise training. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 34(8): 760-765. 2007

Figuerola MS, Peters JI. Congestive heart failure: Diagnosis, pathophysiology, therapy, and implications for respiratory care. *Respiratory Care*. 2006 Apr;51(4):403-12.

Fiuza-Luces C, Garatachea N, Berger NA, et al. (2013). Exercise is the real polypill. *Physiology (Bethesda)*, 28: 330-358.

Friedenreich CM, Cust AE. (2008). Physical activity and breast cancer risk: impact of timing, type and dose of activity and population subgroup effects. *British Journal of Sports Medicine*, 42: 636–647.

Fukuda T, Sumi T, Nobeyama H, Yoshida H, Matsumoto Y, Yasui T, et al. Multiple organ failure of tumor-bearing rabbits in cancer cachexia is caused by apoptosis of normal organ cells. *Int J Oncol*. 2009;34:61–7.

Garcia M Jemal, A, Ward. *EMCenterMMHao. Global Cancer Facts & Figures 2007. American Cancer Society 2007.*

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer cell. 2000; 100:57-70.

Hillman CH, Erickson KI, Kramer AF. (2008). Be smart, exercise your heart: exercise effects on brain and cognition. *Nat Rev Neurosci*, 9: 58-65.

Inui A (1999) Neuropeptide Y: a key molecule in anorexia and cachexia in wasting disorders? *Mol Med Today* 5: 79–85

Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward et al. Global Cancer Statistics. *CA Cancer Journal for Clinics*, 61:69-90. 2011.

Kalantar-Zadeh K, Rhee C, Sim JJ, Stenvinkel P, Anker SD, Kovesdy CP. Why cachexia kills: examining the causality of poor outcomes in wasting conditions. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 2013; 4: 89–94.

Kavazis, AN, et al. Exercise training induces a cardioprotective phenotype and alterations in cardiac subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondrial

proteins. American Journal of physiology, Heart and Circulatory Physiology, Bethesda, v. 297, n. 1, p. H 144-152, 2009

Kazemi-Bajestani SM, Becher H, Fassbender K, Chu Q, Baracos VE. Concurrent evolution of cancer cachexia and heart failure: bilateral effects exist. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 2014;5:95-104

Kobalava Z. The role of natriuretic peptides in the pathogenesis of cardiovascular diseases. *Journal of Hypertension*. 2016.

Kokkinos P, Myers J, Kokkinos JP, et al. (2008). Exercise capacity and mortality in black and white men. *Circulation*, 117: 614–622.

Maillet M, Van Berlo JH, Molkentin JD. Molecular basis of physiological heart growth: fundamental concepts and new players. *Nature Review Molecular Cell Biology*. 2013 Jan; 14(1):38-48.

Mamidanna R, Nachiappan S, Bottle A, Aylin P, Faiz O. Defining the timing and causes of death amongst patients undergoing colorectal resection in England. *Colorectal Discovery* 2016;18:586-93

Monitto C.L. , Berkowitz D. , Lee K.M. , Pin S, Breslow M. , O'Malley B, Schiller M.. Differential gene expression in a murine model of cancer cachexia. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metabolism*, 281(2001), pp. E289-E297.

Moore S, et al. Association of leisure-time physical activity with risk of 26 types of cancer in 1.44 million adults. *JAMA Internal Medicine* 1548. 2016.

Muhfeld C, Das SK, Heinzel FR, Schmidt A, Post H, Schauer S, Papadakis T, Hummer W. Hoefler G. Cancer induces cardiomyocyte remodeling and hypoinnervation in the left ventricle of the mouse heart. *Plos One*, 6(5): e20424. 2011.

National Cancer Institute, NCI. 2015. Disponível em: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>. Acesso em 10 out. 2018.

Naylor LH, George K, O'Driscoll G, Green D (2008). The athlete's heart: a contemporary appraisal of the 'Morganroth hypothesis'. *Sports Med.* 38(1):69-90.

Novoyatleva T., Schymura Y, Janssen W, Strobl F, Swiercs JM, Patra C, Posern G, Wietelmann A, Zheng TS, Schermuly RT, Engel FB. Deletion of fn14 receptor protects from right fibrosis and dysfunction. *Basic Research in Cardiology*. 2013, 108:325.

Oliveira R, Ferreira JCB, Gomes ERM, Paixão NA, Rolim NPL, Medeiros A, Guatimosim S, Brum PC (2008). Cardiac anti-remodelling effect of aerobic training is associated with a reduction in the calcineurin/NFAT pathway in heart failure heart. *The journal of physiology*, 587:3899-3910.

Pahor M, Guralnik JM, Ambrosius WT, et al. (2014). Effect of Structured Physical Activity on Prevention of Major Mobility Disability in Older Adults The LIFE Study Randomized Clinical Trial. *JAMA*, 311:2387-2396.

Patnaik JL, Byers T, DiGuseppi C, Dabelea D, DenbergTD_Cardiovascular disease competes with breast cancer as the leading cause of death for older females diagnosed with breast cancer: a retrospective cohort study. *BreastCancerResearch*. Jun 20; 13 (3): R64 2011.

Riehle C, Wende AR, Zhu Y, Oliveira KJ, Pereira RO, Jaishy BP, Bevins J, Valdez S, Noh J, Kim BJ, et al. Insulin receptor substrates are essential for the bioenergetic and hypertrophic response of the heart to exercise training. *Mol Cell Biol.* 2014; 34:3450–3460.

Rolim NP, Medeiros A, Rosa KT, Mattos KC, Irigoyen MC, Krieger EM, Krieger JE, Negrão CE, Brum PC (2007). Exercise training improves the net balance of cardiac Ca²⁺ handling protein expression in heart failure. *PhysiolGenomics*. May 11; 29(3):246-52.

Ruas, J. L., White, J. P., Rao, R. R., Kleiner, S., Brannan, K. T., Harrison, B. C....Spiegelman, B. M. (2012). A PGC-1 α isoform induced by resistance training regulates skeletal muscle hypertrophy. *Cell*, 151(6), 1319–1331.

Schäfer, M., Oeing, C. U., Rohm, M., Baysal-Temel, E., Lehmann, L. H., Bauer, R., ... Herzog, S. (2016). Ataxin-10 is part of a cachexokine cocktail triggering cardiac metabolic dysfunction in cancer cachexia. *Molecular Metabolism*, 5(2), 67–78.

Scheuer J, Tipton CM. Cardiovascular adaptations to physical training. *Annual Review Physiology*. 1977; 39:221-51.

Schunemann M, Anker SD, Rauchhaus M. Cancer fatigue syndrome reflects clinically non-overt heart failure: an approach towards onco-cardiology. *Nat ClinPractOncol* 2008;5(11):632–3.

Siegel R, Ward E, Brawley O, Jemal A. Cancer Statistics. The impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths. *CA Cancer Journal for Clinics*, 61: 212-236.

Sjostrom M, Wretling ML, Karlberg I, Edén E and Lundholm K: 7. Ultrastructural changes and enzyme activities for energy production in hearts concomitant with tumor-associated malnutrition *J Surg Res* 42: 304-313, 1987

Springer J, Tschirner A, Palus S, Grzesiak A, Kaschina E, 10. Argiles J, von Haehling S and Anker SD: Severe progressive heart failure in experimental cancer cachexia only transiently elevates BNP. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 1:111 (Abst 151), 2010.

Springer, J., Tshirner, A., von Haehling S., Lal, H., Grzesiak, A., et al., 2014. Prevention of liver cancer cachexia-induced cardiac wasting and heart failure. *European Heart Journal* 35:932 – 941.

Sun L, Quan XQ, Yu S. An epidemiological survey of cachexia in advanced cancer patients and analysis on its diagnostic and treatment status. *Nutr Cancer* 2015;67:1056-62.

Tian M, Nishijima Y, Asp ML, Stout MB, Reiser PJ and 9. Belury MA: Cardiac alterations in cancer-induced cachexia in mice. *Int J Oncol* 37: 347-353, 2010.

Tisdale MJ. (2010). Reversing cachexia. *Cell*, 142: 511-512.

Tzika AA1, Fontes-Oliveira CC, Shestov AA, et al. (2013). Skeletal muscle mitochondrial uncoupling in a murine cancer cachexia model. *Int J Oncol*, 43: 886-894.

Tobias, G. C. Contribuição da atividade física aeróbia para a resposta imune antitumoral. 2017. Dissertação de mestrado. Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2017.

Varnava AM, Elliott PM, Baboonian C, Davison F, Davies MJ, McKenna WJ. Hypertrophic cardiomyopathy: histopathological features of sudden death in cardiac troponin T disease. *Circulation*. 2001.18;104 (12):1380-4.

Vogel. (2000). Breast Cancer Prevention: A Review of Current Evidence. *CA Cancer Journal for Clinicians*, 50: 156-170.

Workman P, Aboagye EO, Balkwill F, Balmaind A, Bruder G, Chaplin DJ, Double JA, Everitt J, Farningham DA, Glennie MJ, Kelland LR, Robinson V, Stratford IJ, Tozer GM, Watson S, Wedge SR, Eccles SA. Guidelines for the welfare and use of animals in cancer research. *British Journal of Cancer*. 2010 May 25;102 (11):1555-77.

World Cancer Research Fund, American Institute for Cancer Research. *Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: A Global Perspective*. Washington, DC: American Institute for Cancer Research; 2007.

Xu H, Crawford D, Hutchinson K, Youtz D, Lucchesi P, Velten M, McCarthy D, Wold L. *Life Sciences* 88 (2011) 406–410.

Zhou X, Wang JL, Lu J, et al. (2010). Reversal of cancer cachexia and muscle wasting by ActRIIB antagonism leads to prolonged survival. *Cell*, 142: 531

13 APÊNDICE

13.1 Dados individuais da subseção: “Caracterização do modelo de adenocarcinoma de cólon CT26.” (pg., 53)

13.1.1. Dados individuais da variação da massa corporal total em gramas (g) de camundongos após 19 dias de inóculo.

Dias	Controle					CT26										
ID animal	#13	#10	#4	#8	#3	#7	#2	#18	#20	#16	#22	#1	#11	#17	#6	#25
0	34,3	33,0	32,7	32,2	30,7	31,7	34,8	30,8	31,5	32,7	32,2	32,6	32,0	30,5	32,5	30,6
1	34,9	33,9	33,1	34,2	31,8	31,7	35,4	31,4	32,0	33,6	32,8	33,3	32,8	30,9	33,2	30,7
2	34,8	34,1	32,7	35,1	31,6	32,5	35,3	31,3	32,1	33,5	32,7	33,1	33,0	31,3	33,4	30,3
4	34,2	33,5	33,2	34,3	31,2	32,5	35,6	30,1	31,6	33,4	33,0	33,8	33,4	31,0	32,6	30,5
5	34,5	33,1	32,1	32,6	31,0	31,6	34,9	29,3	31,1	32,4	32,4	33,2	32,2	30,1	30,1	30,0
8	35,0	33,1	31,8	32,9	30,9	30,8	34,3	29,3	31,0	32,2	33,0	32,9	31,9	27,9	31,9	31,9
9	35,1	33,9	32,6	34,1	31,6	30,9	33,5	29,9	30,0	32,1	33,2	32,7	31,7	28,6	32,6	32,6
11	34,4	33,5	31,0	33,5	31,0	29,6	32,2	27,9	29,7	30,6	32,1	31,6	31,0	29,0	31,9	27,8
12	34,4	33,2	32,5	32,6	31,2	28,8	31,4	28,8	29,7	31,3	32,0	31,2	30,3	28,4	31,5	27,3
13	33,3	32,2	31,6	32,8	30,5	28,8	30,7	27,3	29,5	30,2	30,9	29,7	30,0	28,6	30,4	27,3
18	33,3	32,1	31,5	32,8	29,5	29,1	32,2	27,8	29,3	31,5	31,1	29,9	30,3	29,6	31,0	27,3
19	33,6	32,8	31,0	32,1	30,1	29,1	32,8	27,9	29,6	30,9	31,0	30,4	30,7	30,1	31,3	27,9
Média	34,32	33,20	32,15	33,27	30,93	30,59	33,59	29,32	30,59	32,03	32,20	32,03	31,61	29,67	31,87	29,52
Desvio Padrão	0,62	0,63	0,76	0,95	0,66	1,44	1,69	1,42	1,06	1,15	0,82	1,42	1,14	1,15	1,05	1,90
Erro Padrão	0,18	0,18	0,22	0,28	0,19	0,42	0,49	0,41	0,31	0,33	0,24	0,41	0,33	0,33	0,30	0,55

Dados individuais da variação de massa corporal total em gramas (g) de camundongos BALB/c (identificação animal – ID animal) divididos nos grupos Controle e CT26 ao longo dos dias 0 e 19. Média e erro padrão mencionados na tabela.

13.1.2. Massa Corporal Final

	Controle								
ID animal	#13	#10	#4	#4a	#8	#3	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão
MCI	34,3	33	31,4	32,7	32,2	30,7	32,38	1,26	0,52
MCFst	33,6	32,8	30,8	31	32,1	30,1	31,73	1,33	0,54
Tumor	0	0	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00

	CT26													
ID animal	#7	#2	#18	#20	#23	#22	#1	#11	#17	#6	#25	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão
MCI	31,7	34,8	30,8	31,5	32,7	32,2	32,6	32	30,5	32,5	30,6	31,99	1,22	0,37
MCFst	29,1	32,8	27,9	29,6	30,9	31	30,4	30,7	30,1	32,3	27,9	30,25	1,57	0,47
Tumor	-	0,78	0,38	0,47	0,4	0,53	0,62	0,55	0,43	0,47	0,56	0,52	0,12	0,04

Dados individuais da variação de peso corporal inicial (MCI) do dia 1 do período experimental após inóculo das células tumorais e peso corporal final sem o peso do tumor (MCFst) no 19 dia após inóculo das células tumorais em camundongos BALB/c divididos nos grupos Controle e CT26. Média e erro padrão mencionados na tabela, (identificação animal – ID animal)

13.1.3. Massa corporal em gramas (g) no 19º dia após inóculo das células tumorais

ID animal	Controle	ID animal	CT26	Tumor	Diferença massa corporal CT26 - massa Tumor
#13	33,6	#7	29,1		
#10	32,8	#2	32,8	0,78	32,02
#4	30,8	#18	27,9	0,38	27,52
#4a	31	#20	29,6	0,47	29,13
#8	32,1	#23	30,9	0,40	30,50
#3	30,1	#22	31	0,53	30,47
		#1	30,4	0,62	29,78
		#11	30,7	0,55	30,15
		#17	30,1	0,43	29,67
		#6	32,3	0,47	31,83
		#25	27,9	0,56	27,34
Média	31,73	-	30,25	0,52	30,12
Desvio Padrão	1,33	-	1,57	0,12	1,36
Erro Padrão	0,54		0,47	0,04	0,41

Dados individuais da massa corporal total de camundongos BALB/c dos grupos Controle e CT26 no 19 dia após inóculo das células tumorais; massa do tumor e valores referentes às diferenças da massa corporal total do grupo CT26 em relação a massa do tumor. Média e erro padrão mencionados na tabela, (identificação animal – ID animal)

13.1.4. Massa de diferentes tecidos (mg) normalizados pelo comprimento da tíbia (mm) ou razão massa úmida:seca.

	Controle								
	#13	#10	#4	#4a	#8	#3	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão
Tibial Anterior (mg/mm)	3,6	4,1	3,1	2,8	3,3	-	3,40	0,48	0,20
Sóleo (mg/mm)	0,6	0,6	0,6	0,6	0,5	-	0,60	0,05	0,02
Gastrocnêmio (mg/mm)	11,3	10,3	10,4	9,1	8,0	-	9,80	1,28	0,52
Pulmão U/S	8,0	7,0	7,4	7,7	7,2	7,6	7,49	0,34	0,14
Fígado U/S	3,4	3,5	2,8	3,7	3,6	3,6	3,42	0,34	0,14
Epididimal (mg/mm)	11,9	13,1	9,6	12,3	8,5	7,0	10,40	2,42	0,99
Baço (mg/mm)	7,1	12,7	5,7	-	4,9	12,7	8,61	3,83	1,56
Coração (mg/mm)	9,5	9,3	9,0	9,3	8,0	8,3	8,87	0,61	0,25
Diâmetro cardiomiócitos	12,3	12,9	13,3	14,4	13,0	12,3	13,03	0,78	0,32

	CT26											
	#18	#20	#16	#22	#1	#11	#17	#6	#25	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão
Tibial Anterior (mg/mm)	1,7	2,1	2,1	2,1	2,5	1,9	1,5	1,7	2,2	1,99	0,31	0,10
Sóleo (mg/mm)	0,4	-	0,4	0,5	0,5	0,4	0,3	0,4	0,4	0,42	0,07	0,02
Gastrocnêmio (mg/mm)	7,2	7,5	6,5	5,8	6,8	5,9	5,6	5,5	5,9	6,30	0,72	0,24
Pulmão U/S	8,0	8,9	8,3	8,7	8,7	7,0	7,9	7,0	-	8,07	0,74	0,26
Fígado U/S	4,2	4,2	4,0	4,3	4,2	4,4	4,2	4,3	4,4	4,22	0,12	0,04
Epididimal (mg/mm)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,00	0,00	0,00
Baço (mg/mm)	75,8	110,3	103,2	72,8	59,3	80,4	91,9	74,4	-	83,49	17,01	6,01
Coração (mg/mm)	7,7	8,7	8,8	7,9	8,6	7,1	7,6	7,6	-	8,00	0,64	0,23
Diâmetro cardiomiócitos	12,1	10,8	13,9	12,9	12,2	10,8	12,2	-	-	12,13	1,10	0,42

Dados individuais da massa em mg normalizados pelo comprimento da tíbia dos músculos tibial anterior, sóleo, gastrocnêmio, gordura epididimal, baço e coração. Dados individuais da massa corporal total de camundongos BALB/c dos grupos Controle e CT26 no 19 dia após inóculo das células tumorais. Relação da massa úmida e seca em mg (U/S) do pulmão e fígado de camundongos BALB/c dos grupos Controle e CT26 no 19 dia após inóculo das células tumorais. Medida em µm do diâmetro de cardiomiócitos, (identificação animal – ID animal)

13.1.5. Parâmetros ecocardiográficos do modelo experimental CT26 no período anterior e 16 dias após o inóculo das células CT26, pg. 56 e 57.

IVSD	Controle					CT26										
ID animal	#10	#4	#8	#13	#3a	#7	#16	#18	#25	#11	#22	#20	#1	#17	#6	#2
Pré inóculo	0,6844	0,5133	0,7333	0,6844	0,6844	0,5377	0,4644	0,7577	0,6355	0,6844	0,5377	0,5866	0,5377	0,9533	0,5377	0,4888
Pós 16 dpi	0,6111	0,5622	0,5622	0,7333	0,5866	0,6600	0,4888	0,4400	0,4888	0,6111	0,5133	0,5622	0,5377	0,5133	0,5866	0,5622
LVDD	Controle					CT26										
Pré inóculo	2,7377	3,3977	4,4488	3,0222	3,9600	3,4711	4,1800	4,3266	3,4222	4,2288	3,5688	3,5200		3,9844	3,3977	3,3733
Pós 16 dpi	3,9355	3,4466	4,0333	3,9844	4,4733	3,7400	4,4977	3,9355	4,7666	3,8377	4,6688	4,2533		4,5466	4,2533	3,6911
LVPWD	Controle					CT26										
Pré inóculo	0,5133	0,5866	0,7333	0,7088	0,7333	0,6844	0,5622	0,7088	0,7577	0,7333	0,44	0,6355	0,5133	0,7577	0,7333	0,3911
Pós 16 dpi	0,66	0,6355	0,5377	0,7822	0,5377	0,4888	0,5866	0,5866	0,7333	0,5662	0,6844	0,8066	0,4888	0,5377	0,66	0,3666
IVSS	Controle					CT26										
Pré inóculo	0,8800	1,0022	1,2466	0,9777	0,8311	0,9777	1,0022	1,0755	0,7333	1,1244	1,0022		1,0755			
Pós 16 dpi	0,8060	1,0022	0,9533	0,9288	0,9044	1,0266	1,0755	0,9777	1,0266	1,0755	0,9533		1,0022			
LVDS	Controle					CT26										
Pré inóculo	1,4911	1,8577	2,6888	2,1266	2,3711	2,0288	2,5911	2,9088	2,0777	2,6644	2,2244	2,1755	2,0077	2,6888	2,0777	1,9311
Pós 16 dpi	3,4466	2,0533	2,3222	2,2428	3,0800	2,4444	3,0800	2,2488	3,7888	2,0288	3,1777	1,5888	2,6400	2,4200	2,8355	2,4688
LVPWS	Controle					CT26										
Pré inóculo	0,8555	0,8800	1,2955	0,7822	1,0266	1,0022	1,0022	1,1733	1,0511	1,2711	0,9288	1,1244	0,9777	0,7577	1,1488	0,7822
Pós 16 dpi	0,8555	0,7822	1,0266	1,2466	1,1000	1,1244	0,9777	1,3200	0,9533	1,3200	1,0022	0,7822	0,9777	1,2955	1,0511	1,0022

F.ejeção	Controle						CT26											
	#4	#10	#4a	#8	#13	#3a	#7	#16	#18	#5	#25	#11	#22	#20	#1	#17	#6	#2
Pré inóculo	78,6	77,7	70,2	63,7	-	71,3	73,5	68,6	61,4	70,9	70,9	68,7	77,9	72,8		61,4	70,3	74,9
Pós 16 dpi	-	72	73,9	75	65,6	59	64	59,5		41		60	76	68,4	63,5		62,3	62,5

F.encurt.	Controle						CT26											
Pré inóculo	45,5	45,3	39,5	33,5		40,1	41,5	38,0	32,7	39,2	40,0	37,6	46,0	40,9		32,5	38,8	42,7
Pós 16 dpi		40	42,4	43,5	35,4	31	34,6	31,5	31,9		37,9	34,1		33,3	33,1			

DDFVE, diâmetro do ventrículo esquerdo na diástole; DSFVE, diâmetro do ventrículo esquerdo na sístole; SIVD, septo interventricular na diástole; SIVS, septo interventricular na sístole; PPVED, parede do ventrículo esquerdo na diástole; PPVES, parede do ventrículo esquerdo durante sístole (mm), (identificação animal – ID animal)

13.2 Dados individuais da subseção: Efeito do treinamento físico aeróbio sobre a função e estrutura cardíacas no modelo experimental de caquexia do câncer do adenocarcinoma de cólon (CT26).

13.2.1. Teste de esforço máximo em esteira rolante

Teste Maximo																Média	Desvio Padrão	Erro Padrão
ID animal	#9	#10	#12	#23	#27	##10	##14	##24	##6	##524								
Controle	591,5	625,2	633	981	751,5	467	535,5	550	741,5	486						636,22	153,74	48,6
ID animal	#5	#6	#7	#8	#13	#14	#11	##Nulo	##8	##12	##16	##6	##7	##17	##11			
SED	414	601,5	633	587,2	773,6	735,9	657	324,2	502	546	519	430	435,6	459	520	542,53	124,08	32,0
ID animal	#20	#16	#17	#18	#19	#24	#2											
TR	1007,3	898,2	642	676,2	1007,3	901	885,6									859,66	146,34	55,3

Dados individuais do teste de capacidade aeróbia máxima de camundongos BALB/c dos grupos Controle , sedentário (SED) e treinado (TR) previamente ao período de protocolo de treinamento físico aeróbio em esteira rolante. Dados em metros. Média e desvio padrão mencionados na tabela, (identificação animal – ID animal, quantidade de # indicam lotes diferentes)

13.2.2. Massa Corporal total de camundongos controle, CT26 e CT26 TR ao longo do período experimental

Massa Corporal total - temporal													
Dias	Controle										Média	Desvio Padrão	Erro Padrão
1°	30,4	31	30,8	30,4	30,8	34,3	33	32,7	32,2	30,7	31,63	1,34	0,42
2°	30,7	31,6	31,3	31,8	30,9	34,9	33,9	33,1	34,2	31,8	32,42	1,49	0,47
3°	30,1	31,5	31,2	30,5	31,3	34,8	34,1	32,7	35,1	31,6	32,29	1,79	0,57
7°	29,2	29,5	30,8	31,5	31,9	34,2	33,5	33,2	34,3	31,2	31,93	1,83	0,58
8°	29,4	30,4	30,9	30,7	31,7	34,5	33,1	32,1	32,6	31	31,64	1,48	0,47
9°	29,6	30,4	32,9	30,7	31,9	35	33,1	31,8	32,9	30,9	31,92	1,60	0,51
10°	31,2	31,5	33,8	32,4	33,6	35,1	33,9	32,6	34,1	31,6	32,98	1,31	0,41
11°	30,7	32,1	33	30,6	31,8	34,4	33,5	31	33,5	31	32,16	1,36	0,43
14°	29,5	30,5	31,6	31,3	32,1	34,4	33,2	32,5	32,6	31,2	31,89	1,39	0,44
15°	29,1	30,3	30,8	31,3	31,9	33,3	32,2	31,6	32,8	30,5	31,38	1,26	0,40
17°	30,1	31,4	33,7	32	32,6	33,3	32,1	31,5	32,8	29,5	31,9	1,33	0,42
ID animal	#9	#10	#28	#12	#23	#27	##10	##4	##8	##3			

Dados individuais da variação de massa corporal total em gramas (g) de camundongos BALB/c do grupo Controle ao longo dos dias 0 e 17 do período experimental após inóculo das células tumorais. Média e erro padrão mencionados na tabela, (identificação animal – ID animal, quantidade de # indicam lotes diferentes).

13.2.3. Continuação dos dados acima

Massa Corporal total - temporal																	
CT26															Média	Desvio Padrão	Erro Padrão
31,3	31,2	30,8	30,2	33,8	29,9	30,2	30,8	31,5	32,7	30,6	32,2	32,6	32	32,5	31,49	1,12	0,29
31,5	31	31,4	30,7	34,5	30,9	29,2	31,4	32	33,6	30,7	32,8	33,3	32,8	33,2	31,93	1,40	0,36
30,3	29,9	30,4	29,5	32,8	30,5	28,9	31,3	32,1	33,5	30,3	32,7	33,1	33	33,4	31,45	1,57	0,40
29,2	28,7	29	27,6	32,7	29,5	26,8	30,1	31,6	33,4	30,5	33	33,8	33,4	32,6	30,79	2,29	0,59
29,1	27,9	28,9	27,5	31,4	28,5	26,2	29,3	31,1	32,4	30	32,4	33,2	32,2	30,1	30,01	2,06	0,53
27,3	29,4	27,6	26,4	31,4	28,4	28	29,3	31	32,2	31,9	33	32,9	31,9	31,9	30,17	2,22	0,57
29,4	28,1	28,7	27,1	31,4	28,4	25,7	29,9	30	32,1	32,6	33,2	32,7	31,7	32,6	30,24	2,31	0,60
28,3	26,8	27,1	26,5	30,8	28	25,7	27,9	29,7	30,6	27,8	32,1	31,6	31	31,9	29,05	2,15	0,56
29,4	26,5	27,2	26,6	30,9	27,6	24,4	28,8	29,7	31,3	27,3	32	31,2	30,3	31,5	28,98	2,28	0,59
29,3	26	26,7	25,9	29,2	28,4	24,7	27,3	29,5	30,2	27,3	30,9	29,7	30	30,4	28,37	1,92	0,49
28,3	26,1	26,7	26,6	30,9	31,2	27,6	27,8	29,3	31,5	27,3	31,1	29,9	30,3	31	29,04	1,93	0,50
#5	#6	#7	#8	#13	#14	#11	##18	##20	##23	##22	##1	##11	##17	##6			

Dados individuais da variação de massa corporal total em gramas (g) de camundongos BALB/c do grupo CT26 ao longo dos dias 0 e 17 do período experimental após inóculo das células tumorais. Média e erro padrão mencionados no final, (identificação animal – ID animal, quantidade de # indicam lotes diferentes).

13.2.4.. Continuação dos dados acima

Massa Corporal total - temporal									
CT26 TR							Média	Desvio Padrão	Erro Padrão
28,3	31,8	29,4	28	30	32,8	31,2	30,2	1,80	0,68
28	31,9	29,8	28,1	29,6	33,2	31,4	30,3	1,96	0,74
27,2	30,4	28,8	27,4	28,8	31,5	30,3	29,2	1,61	0,61
30,2	30,2	29	27,6	29	30,5	30,3	29,5	1,06	0,40
27,9	30,2	29,2	28,3	29,2	30,7	30,1	29,4	1,03	0,39
25,7	28,2	27,3	28,2	27,9	29,3	28,3	27,8	1,12	0,42
28,2	30,4	29,9	28,2	29,3	30,7	30,3	29,6	1,04	0,39
26,5	28,5	27,8	27,1	27,6	29	30,1	28,1	1,22	0,46
28	29,8	28,4	27,2	27,5	29,2	30,5	28,7	1,22	0,46
27,7	29,8	28,5	27,5	27,9	29,2	31,1	28,8	1,31	0,49
27,4	30,4	28,5	27,1	28	28	31,2	28,7	1,55	0,59
#16	#17	#18	#19	#20	#24	#2			

Dados individuais da variação de massa corporal total em gramas (g) de camundongos BALB/c do grupo CT26 TR ao longo dos dias 0 e 17 do período experimental após inóculo das células tumorais. Média e erro padrão mencionados no final, (identificação animal – ID animal, quantidade de # indicam lotes diferentes).

13.2.5..Massa Corporal na ausência da massa tumoral após 19 dias de injeção das células tumorais CT26 em camundongos.

Massa Corporal Final - livre da massa tumoral																Média	Erro Padrão
Controle	30,1	31,4	33,7	32	32,6	33,6	32,8	30,8	31	32,1						32,01	0,38
ID animal	#9	#10	#28	#12	#23	#27	##10	##4	##8	##3							
CT26 SED	28,05	25,79	26,2	26,26	31,11	27,08	27,52	29,13	30,5	30,47	29,78	30,15	29,67	31,83	27,34	28,73	0,50
ID animal	#5	#6	#7	#8	#13	#14	#11	##18	##20	##23	##22	##1	##11	##17	##6		
CT26 TR	27,21	29,76	28,17	26,54	27,54	27,75	30,93									28,27	0,58
ID animal	#16	#17	#18	#19	#20	#24	#2										

Dados individuais da massa corporal total em gramas (g) livre da massa tumoral de camundongos BALB/c dos grupos Controle; CT26 SED e CT26 TR no 19 dia após inóculo das células tumorais. Média e erro padrão mencionados no final, (identificação animal – ID animal, quantidade de # indicam lotes diferentes).

13.2.6.. Volume tumoral de de camundongos BALB/c dos grupos CT26 SED e CT26 TR.

Volume Tumoral - temporal										
Dias	CT26 SED							Média	Erro Padrão	Desvio Padrão
1°	0	0	0	0	0	0	0	0,00	0,0	0,00
2°	0	0	0	0	0	0	0	0,00	0,0	0,00
3°	0,07	0,01	0,03	0	0,01	0,01	0	0,02	0,0	0,02
4°	0,11	0,03	0,03	0,03	0,1	0,09	0,04	0,06	0,0	0,04
6°	7,19	4,16	4,08	8,13	6,72	12,89	4,78	6,85	1,2	3,09
9°	47,9	78,88	40,18	70,42	69,71	80,43	54,2	63,10	5,9	15,72
10°	290,21	175,76	152,86	167,52	214,63	216,77	163,91	197,38	18,1	47,88
11°	244,78	265,36	178,89	294,37	258,78	219,06	476,19	276,78	36,0	95,28
12°	247,09	354,02	219,33	593,92	233,87	252,25	534,9	347,91	58,6	155,12
13°	292,12	394,01	207,41	413,32	369,01	251,09	606,47	361,92	49,9	132,01
16°	294,86	544,35	427,32	417,29	317,22	267,84	679,36	421,18	56,1	148,41
17°	381,02	649,21	431,68	658,4	582,01	347	884,71	562,00	71,9	190,35
18°	305,96	645,75	450,68	581,08	728,2	466,54	901,57	582,83	74,7	197,62
19°	325,17	963,14	773,96	1187,16	1211,46	660,84	492,54	802,04	127,8	338,09
ID	#5	#6	#7	#8	#13	#14	#11			

	Volume Tumoral - temporal									
Dias	CT26 TR							Média	Desvio Padrão	Erro Padrão
1°	0	0	0	0	0	0	0	0,00	0,00	0,0
2°	0	0	0	0	0	0	0	0,00	0,00	0,0
3°	0,01	0	0	0	0	0,01	0	0,00	0,00	0,0
4°	0,04	0,02	0,01	0	0	0,01	0,01	0,01	0,01	0,0
6°	4,58	3,12	0,52	0,46	0,83	1,07	1,5	1,73	1,55	0,6
9°	33,28	12,13	26,75	32,03	20,49	11,68	27,65	23,43	8,89	3,4
10°	128,4	101,4	97,84	96,2	91,91	94,68	164,92	110,76	26,85	10,1
11°	123,26	92,2	99,1	150,83	163,09	116,1	146,39	127,28	26,98	10,2
12°	174,3	146,85	157,76	167,69	208,66	248,02	230,95	190,60	38,80	14,7
13°	239,99	194,67	228,13	254,8	239,29	302,4	307,84	252,45	40,47	15,3
16°	244	453,08	313,7	348,42	329,32	364,5	367,42	345,78	63,24	23,9
17°	407,09	558,11	469,55	527,88	497,02	430,61	470,94	480,17	52,65	19,9
18°	511,26	483,23	430,61	379,94	414,46	542,88	697,65	494,29	106,17	40,1
19°	800,8	479,2	598,16	408,38	436,61	728	1365	688,02	333,09	125,9
ID	#16	#17	#18	#19	#20	#24	#2			

Dados individuais do volume tumoral (mm³) de de camundongos BALB/c dos grupos CT26 SED e CT26 TR ao longo dos dias 1 e 19 após inóculo das células tumorais. Média e erro padrão dos grupos indicado no final, (identificação animal – ID animal, quantidade de # indicam lotes diferentes).

13.2.7. Caquexia induz alteração de diferentes tecidos de camundongos inoculados com células tumorais do carcinoma de cólon (CT26).

[illegible]

Gastrocnêmio (mg/mm)																Média	Erro Padrão
Controle	7,93	9,58	8,23	8,73	8,61	11,29	10,28	10,36	9,07	8						9,21	0,36
CT26 SED	6,97	6,01	5,36	4,96	7,25	6,99	4,78	7,24	7,45	6,45	5,77	6,82	5,93	5,62		6,26	0,24
CT26 TR	6,97	6,01	5,36	4,96	7,25	6,99	4,78	7,24	7,45	6,45	5,77	6,82	5,93	5,62	5,49	6,21	0,23

[illegible][illegible]

Pulmão (U/S)																	Média	Erro Padrão
Controle	7,97	7,03	7,4	7,71	8,28	7,21	4,61	4,38	4,35	6,1							6,5	0,49
CT26 SED	5,23	5,68	8,04	8,87	8,32	8,67	8,7	7,03	7,93	6,96	10,05	6,18	5,08	5,47	4,34		7,1	0,44
CT26 TR	4,91	4,79	4,88	4,94	5,4	4,97											4,98	0,08

Fígado (U/S)																	Média	Erro Padrão
Controle	3,39	3,53	2,75	3,67	3,57	3,62	3,48	3,26	3,27	3,38							3,39	0,09
CT26 SED	4,18	4,2	3,97	4,29	4,18	4,35	4,19	4,27	4,38	3,85	3,98	3,8	3,8	4,1	3,99		4,1	0,05
CT26 TR	3,98	3,85	4,03	3,96	4,12	4,32											4,04	0,06
Gordura Epididimal (mg/mmm)																	Média	Erro Padrão
Controle	11,89	13,11	9,63	12,3	8,46	6,98		11,52	4,75	7,43	10,29						9,64	0,85
CT26 SED	0	0	1,23	1,71	2,69	0,48	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0,41	0,70
CT26 TR	0	0	1,32	0	0,88	1,6	2,73										0,93	0,39
ID animal																		
Controle	#9	#10	#28	#12	#23	#27	##10	##4	##8	##3								
CT26 SED	#5	#6	#7	#8	#13	#14	#11	##18	##20	##16	##22	##1	##11	##17	##25			
CT26 TR	#16	#17	#18	#19	#20	#24	#2											

Dados individuais da massa em mg normalizados pelo comprimento da tibia em mm dos músculos tibial anterior; sóleo, gastrocnêmio; gordura epididimal; coração. Dados individuais da massa corporal total de camundongos BALB/c dos grupos Controle, CT26 SED e CT26 TR no 19 dias após inóculo das células tumorais. Relação da massa úmida e seca em mg (U/S) do pulmão e fígado de camundongos BALB/c dos grupos Controle e CT26 no 19 dia após inóculo das células tumorais. Medida em μm do diâmetro de cardiomiócitos, (identificação animal – ID animal, quantidade de # indicam lotes diferentes).

13.2.8.. Parâmetros dos diâmetros cardíacos mensurados por ecocardiografia em camundongos inoculados com células CT26 e submetidos ao TFA.

IVSD (mm)				LVDD (mm)				LVPWD (mm)			
	Controle	CT26 SED	CT26 TR		Controle	CT26 SED	CT26 TR		Controle	CT26 SED	CT26 TR
	0,48880	0,70880	0,66000		3,4222	3,5688	3,8377		0,6355	0,7822	0,7090
	0,70880	0,68440	0,61110		4,2290	3,6911	3,9110		0,6600	0,7088	0,7577
	0,68440	0,70880	0,88000		3,8377	3,4222	3,3977		0,6840	0,7577	0,8311
	0,56220	0,46440	0,56200		3,4222	3,4000	3,5200		0,5130	0,6600	0,8310
	0,61110	0,66000	0,51300		4,2044	3,9600	3,3490		0,6111	0,6111	0,5622
	0,61110	0,73330	0,95330		3,9355	3,7644	3,9844		0,6600	0,6111	0,7822
	0,56220	0,66000	0,83110		3,4466	3,7400	3,7400		0,6355	0,4888	0,7577
	0,56220	0,48880			4,0333	4,4977			0,5377	0,5866	
	0,73330	0,44000			3,9844	3,9355			0,7822	0,5866	
	0,58660	0,75770			4,4733	4,7666			0,5377	0,7333	
		0,48880				3,8377				0,5662	
		0,61110				4,6688				0,6844	
		0,51330				4,2533				0,8066	
		0,56220				4,1555				0,4888	
		0,53770				4,5466				0,7822	
		0,51330				4,2533				0,5377	
		0,58660								0,6600	
		0,56220								0,3666	
Média	0,61	0,59	0,72		3,90	4,03	3,68		0,63	0,63	0,75
Desvio Padrão	0,08	0,10	0,17		0,37	0,44	0,25		0,08	0,12	0,09

Erro Padrão	0,02	0,03	0,06		0,12	0,12	0,10		0,03	0,03	0,03
	IVSS (mm)				LVDS (mm)				LVPWS (mm)		
	Controle	CT26 SED	CT26 TR		Controle	CT26 SED	CT26 TR		Controle	CT26 SED	CT26 TR
	0,8555	1,0755	1,1977		2,0288	2,3711	2,4200		0,9044	1,1488	0,9044
	0,7577	1,0022	1,2222		2,6890	2,5177	2,4688		1,0022	0,9777	1,0022
	1,0022	1,2711	1,1000		2,3955	1,8822	2,3955		1,0266	1,1000	1,4177
	0,6360	0,7088	0,6844		2,3466	2,2244	2,0533		0,9044	1,0266	1,0755
	1,0022	1,2222	0,8555		2,5177	2,4688	2,1755		1,1488	1,2222	0,7088
	0,8060	1,0266	1,2466		3,4466	2,7622	3,2511		0,8555	1,1244	1,0266
	1,0022	1,0266	1,1295		2,0533	2,4444	2,3955		0,7822	1,1244	1,2955
	0,9533	1,0755			2,3222	3,0800			1,0266	0,9777	
	0,9288	0,9777			2,2428	2,2488			1,2466	1,3200	
	0,9044	1,0266			3,0800	3,7888			1,1000	0,9533	
		1,0755				2,0288				1,3200	
		1,1488				3,1777				1,0022	
		0,6844				1,5888				0,7822	
		0,9533				2,6400				0,9777	
		0,8555				2,7377				1,1448	
		1,0022				2,4200				1,2955	
		0,7577				2,8355				1,0511	
		0,8066				2,4688				1,0022	
Média	0,88	0,98	1,06		2,51	2,54	2,45		1,00	1,09	1,06
Desvio Padrão	0,12	0,17	0,21		0,45	0,50	0,38		0,14	0,14	0,24
Erro Padrão	0,04	0,04	0,08		0,14	0,13	0,14		0,04	0,04	0,09

Fração de Ejeção (%)			
Controle	CT26 SED	CT26 TR	
72,6	63,31	67,55	
68,36	60,68	67,39	
60,4	62,34	57,63	
71,16	68,34	73,61	
72	52,82	64,38	
73,9	62,01	38,62	
75	64	66,35	
65,6	59,5		
59	41		
	60		
	63,5		
	62,3		
	62,5		
	47,8		
	42		
Média	68,67	58,14	62,22
Desvio Padrão	5,83	8,30	11,44
Erro Padrão	1,94	2,14	4,32

Fração de Encurtamento (%)			
Controle	CT26 SED	CT26 TR	
40,71	33,56	24,2046	
32,07	31,78	35,97139	
37,57	45	42,36364	
31,42	32,59	26,28247	
40,11	37,65	48,46652	
40	26,62	41,83155	
42,4	32,65		
43,5	34,6		
35,4	31,5		
31	31,9		
	37,9		
	34,1		
	33,3		
	33,1		
Média	37,42	34,02	36,52
Desvio Padrão	4,67	4,16	9,61
Erro Padrão	1,48	1,07	3,92

ID animal															
Controle	#9	#10	#28	#12	#23	#27	##10	##4	##8	##3					
CT26 SED	#5	#6	#7	#8	#13	#14	#11	##18	##20	##16	##22	##1	##11	##17	##25
CT26 TR	#16	#17	#18	#19	#20	#24	#2								

DDFVE, diâmetro do ventrículo esquerdo na diástole; DSFVE, diâmetro do ventrículo esquerdo na sístole; SIVD, septo interventricular na diástole; SIVS, septo interventricular na sístole; PPVED, parede do ventrículo esquerdo na diástole; PPVES, parede do ventrículo esquerdo durante sístole (mm). Fração de ejeção e encurtamento (%), (identificação animal – ID animal, quantidade de # indicam lotes diferentes).

13.2.9. Medidas morfológicas: Diâmetro de cardiomiócitos e percentual de colágeno acumulado no tecido cardíaco de camundongos inoculados com células CT26 e submetidos ao TFA.

	Diâmetro de cardiomiócitos														
	Control e	CT26 SED	CT26 TR												
	12,30	14,10	17,05												
	11,90	12,30	14,63												
	13,30	12,10	14,43												
	14,40	10,80	13,86												
	13,00	13,90	12,27												
	15,72	12,90	12,48												
	16,20	12,20													
	16,60	10,80													
	16,50	12,20													
	15,70	15,40													
	17,60	10,10													
		14,60													
		13,30													
Média	14,84	12,67	14,12												
Desvio Padrão	1,95	1,57	1,74												
Erro Padrão	0,59	0,41	0,71												
ID animal															
Controle	##13	#10	#4	#12	#23	#27	##10	##4	##8	##3					
CT26 SED	##2	##18	##16	##22	##1	##11	##17	##25	#5	#6	#7	#8	#13	#14	#11
CT26 TR	#16	#17	#18	#19	#20	#24	#2								

	Colágeno Total			Colágeno Tipo I			Colágeno Tipo III		
	Controle	CT26 SED	CT26 TR	Controle	CT26 SED	CT26 TR	Controle	CT26 SED	CT26 TR
	1,5600	2,2900	4,2600	0,2710	1,5392	0,4095	0,0470	1,1021	0,1769
	1,3600	10,6100	6,9900	0,2886	1,9725	0,8741	0,0949	1,1384	0,4261
	1,2600	2,4600	3,6200	0,4836	0,9227	0,6616	0,2007	0,5973	0,4357
	0,9000	16,1000		0,1794	1,0812		0,2061	0,5192	
		15,5000			1,0320			0,4304	
Média	1,27	9,39	4,96	0,31	1,31	0,65	0,14	0,76	0,35
Desvio Padrão	0,28	6,75	1,79	0,13	0,44	0,23	0,08	0,34	0,15
Erro Padrão	0,14	3,02	1,03	0,06	0,20	0,13	0,04	0,15	0,08
ID animal									
Controle	#10	#23	#27	#9					
CT26 SED	#5	#8	#13	##25	##13				
CT26 TR	#16	#20	#2						

Dados individuais no quadro esquerdo do diâmetro de cardiomiócitos (mm) dos grupos Controle;CT26 SED e CT26 TR de camundongos Balb/c. No quadro direito estão dispostos os valores individuais do colágeno total dos grupos Controle;CT26 SED e CT26 TR em µm em percentual em relação à fração do volume total. Média e erro padrão dos valores, (identificação animal – ID animal, quantidade de # indicam lotes diferentes).

13.2.10. Classificação da inflamação cardíaca presente no tecido cardíaco de camundongos inoculados com células CT26 e submetidos ao TFA.

Classificação de inflamação Cardíaca		Ventrículo Esquerdo (% da área demarcada)			Ventrículo Direito (% da área demarcada)		
0	Sem inflamação	Controle	CT26 SED	CT26 TR	Controle	CT26 SED	CT26 TR
1	Menos que 10%	3,61	9,94	2,06	3,42	68,37	0,95
2	10–30%	1,55	10,51	3,27	1,84	33,15	4,59
3	30–50%	0,06	29,98	6,14	0,15	34,06	5,21
4	50–90%	0,91	6,73	4,87	0,08	10,85	2,37
5	Mais que 90%		2,82			10,23	
Média		1,53	11,99	4,08	18,02	31,33	3,28
Desvio Padrão		1,51	10,51	1,79	1,59	23,74	1,98
Erro Padrão		0,76	4,70	0,90	0,79	10,60	0,99

Classificação da inflamação cardíaca de 0 a 5 e percentual correspondente à área com inflamação do tecido cardíaco. Quadro à direita estão os valores referentes à área demarcada de inflamação presente no ventrículo esquerdo e ventrículo direito. Média e erro padrão no final da tabela, (identificação animal – ID animal, quantidade de # indicam lotes diferentes).

13.2.11. Continuação do conteúdo anterior: classificação da inflamação cardíaca para o ventrículo esquerdo (VE) e ventrículo direito (VD).

	VE			VD		
	Controle	CT26 SED	CT26 TR	Controle	CT26 SED	CT26 TR
	1	2	1	1	4	0
	1	2	1	1	3	1
	0	3	1	0	3	1
	0	1	1	0	2	1
		1			2	
Média	0,50	1,80	1,00	0,50	2,80	0,75
Desvio Padrão	0,58	0,84	0,00	0,58	0,84	0,50
Erro Padrão	0,29	0,42	0,00	0,29	0,42	0,25

Valores definidos de acordo com a classificação da inflamação cardíaca para o ventrículo esquerdo e ventrículo direito nos grupos experimentais. Média e erro padrão no final da tabela, (identificação animal – ID animal, quantidade de # indicam lotes diferentes).

13.2.11. Expressão Gênica de genes envolvidos no processo de inflamação e fibrose do tecido cardíaco de camundongos inoculados com células CT26 e submetidos ao TFA.

Expressão Gênica – valores normalizados por níveis de mRNA de ciclofilina

	Smad2			Smad3			SDHA			TGF- β		
	Controle	CT26 SED	CT26 TR	Controle	CT26 SED	CT26 TR	Controle	CT26 SED	CT26 TR	Controle	CT26 SED	CT26 TR
	1,22	0,81	0,49	1,05	0,71	0,75	0,71	0,78	0,28	1,29	1,14	0,8
	1,21	0,65	0,57	1,31	0,92	0,46	0,85	0,52	0,47	0,94	1,14	0,79
	0,87	0,44	0,47	0,79	1	0,78	0,96	0,76	0,51	0,79	0,8	1,33
	0,59	0,48	0,81	0,8	0,62	1	1,4	0,46	1,05	0,79	1,92	0,95
	1,43	0,79	0,93	0,73	1,31	1,25	0,76	0,26	0,32	0,91	1,54	1,37
	1,02	0,48	0,51	0,87	0,91	0,91	1,3	0,35	0,86	1,08	1,21	0,92
	0,76	0,62	0,72	0,74	0,89	0,8	1,4	0,68		1,03	2	
	1,39	1,12		0,34	1,75		1,24	0,53		0,55	1,16	
	0,54	0,5		0,75	0,46		0,55	0,28		1,02		
	0,96	0,71			0,93		0,84					
Média	1,00	0,66	0,64	0,82	0,95	0,85	1,00	0,51	0,58	0,93	1,36	1,03
Desvio padrão	0,31	0,21	0,18	0,26	0,36	0,24	0,31	0,20	0,31	0,21	0,42	0,26
Erro Padrão	0,10	0,10	0,07	0,09	0,11	0,09	0,10	0,07	0,13	0,07	0,15	0,11

	Smad2/Smad3			ANP			BNP		
	Controle	CT26 SED	CT26 TR	Controle	CT26 SED	CT26 TR	Controle	CT26 SED	CT26 TR
	1,16	1,14	0,65	0,52	0,73	0,54	0,2	0,67	0,91
	0,92	0,71	1,24	1,55	0,72	0,55	2,46	0,34	0,47
	1,1	0,44	0,61	1,91	0,27	2,09	0,47	0,61	2,16
	0,74	0,77	0,81	1,46	0,95	1,32	0,84	0,84	0,84
	0,55	0,6	0,74	0,53	1,22	0,44	1,15	0,39	1,06
	1,4	0,53	0,56	1,36	1,26	0,73	0,89	1,05	0,34
	0,88	0,7	0,9	1	0,8	1,18	0,65	1,18	0,52
	1,88	0,64	1,22	0,23	0,67	0,57	0,99	1,05	0,64
	1,6	1,08		0,87	2,75		0,35	1,37	
	1,27						2		
Média	1,15	0,73	0,84	1,05	1,04	0,93	1,00	0,83	0,87
Desvio Padrão	0,40	0,24	0,26	0,56	0,71	0,57	0,72	0,36	0,58
Erro Padrão	0,13	0,08	0,09	0,19	0,24	0,20	0,23	0,12	0,20

ID animal										
Controle	#23	##8	#28	##524	#10	##3a	##14	##8	##6	
CT26 SED	#5	#13	##13	##25	##1	#7	#6	##18	##17	#14
CT26 TR	#19	#20	#16	#18	##2	##9	##13	##11		

Dados individuais dos níveis de mRNA dos genes Smad2, Smad3, TGFR- β , SDHA, ANP e BNP a partir da normalização dos dados pelos níveis de mRNA do gene ciclofilina. Média e desvio padrão no final da tabela, (identificação animal – ID animal, quantidade de # indicam lotes diferentes).

13.2.12. Expressão Proteica dos Complexos mitocondriais – valores normalizados pela expressão de GAPDH.

	Complexo V			Complexo IV			Complexo II			Complexo I		
	Controle	CT26 SED	CT26 TR	Controle	CT26 SED	CT26 TR	Controle	CT26 SED	CT26 TR	Controle	CT26 SED	CT26 TR
	1,26	1,18	1,07	1,61	1,17	1,38	1,11	1,05	1,05	0,43	0,84	0,52
	1,41	1,09	1,29	1,34	1,05	1,28	1,20	1,00	1,20	0,88	0,88	1,00
	1,26	1,30	0,97	1,40	1,14	1,23	1,21	1,01	1,20	0,98	0,89	1,10
	1,15	1,18	0,97	1,23	1,01	1,22	1,01	0,96	1,06	0,88	0,89	0,98
	1,13	1,03		1,17	1,03		0,95	0,89		1,11	0,83	
		1,06		1,05	1,06			0,97			0,93	
		1,07		1,22	1,05			1,05			0,88	
		1,30			1,15			1,07			1,08	
		1,37			1,52			1,38			0,88	
Média	1,24	1,18	1,08	1,29	1,13	1,28	1,09	1,04	1,13	0,86	0,90	0,90
Desvio Padrão	0,11	0,12	0,15	0,18	0,16	0,07	0,12	0,14	0,08	0,26	0,07	0,26
Erro Padrão	0,05	0,04	0,07	0,07	0,05	0,04	0,05	0,05	0,04	0,11	0,02	0,13

ID animal									
Controle	#23	#10	##4	##3a	##8				
CT26 SED	##18	##20	##16	##22	##1	##11	##17	#6	##25
CT26 TR	#16	#20	#18	#19					

Dados individuais dos valores de expressão proteica dos complexos mitocondriais V, IV, II e I dos grupos controle , CT26 SED e CT26 TR. Todos os valores foram anteriormente normalizados por níveis de

expressão proteica de GAPDH. Valores de média e erro padrão apresentados no final da tabela, (identificação animal – ID animal, quantidade de # indicam lotes diferentes).

13.2.13. Tabela modelo utilizada para progressão de treinamento aeróbico em esteira para camundongos.

Progressão da Intensidade de Treinamento - Camundongos BALB/c - Esteira Rolante sem Inclinação															
1ª Semana de treino	Dia 1			Dia 2			Dia 3			Dia 4			Dia 5		
	Temp (min)	Vel (m/min)	% Vel _{Máx}	Temp (min)	Vel (m/min)	% Vel _{Máx}	Temp (min)	Vel (m/min)	% Vel _{Máx}	Temp (min)	Vel (m/min)	% Vel _{Máx}	Temp (min)	Vel (m/min)	% Vel _{Máx}
	5	8,5	25,3	5	8,5	25,3	5	8,5	25,3	5	8,5	25,3	5	8,5	25,3
	10	15,0	38,0	10	15,0	38,0	10	15,0	38,0	10	15,0	38,0	10	15,0	38,0
	10	16,3	48,1	10	16,3	48,1	10	16,3	48,1	10	16,3	48,1	10	16,3	48,1
	20	20,4	60,0	20	20,4	60,0	20	20,4	60,0	20	20,4	60,0	20	20,4	60,0
	5	8,5	25,3	5	8,5	25,3	5	8,5	25,3	5	8,5	25,3	5	8,5	25,3
Tempo total sessão: 50 min			Tempo total sessão: 50 min			Tempo total sessão: 50 min			Tempo total sessão: 50 min			Tempo total sessão: 50 min			
2ª Semana de treino	Dia 1			Dia 2			Dia 3			Dia 4			Dia 5		
	Temp (min)	Vel (m/min)	% Vel _{Máx}	Temp (min)	Vel (m/min)	% Vel _{Máx}	Temp (min)	Vel (m/min)	% Vel _{Máx}	Temp (min)	Vel (m/min)	% Vel _{Máx}	Temp (min)	Vel (m/min)	% Vel _{Máx}
	5	8,5	25,3	5	8,5	25,3	5	8,5	25,3	5	8,5	25,3	5	8,5	25,3
	5	15,0	38,0	5	15,0	38,0	5	15,0	38,0	5	15,0	38,0	5	15,0	38,0
	10	16,3	48,1	10	16,3	48,1	10	16,3	48,1	10	16,3	48,1	10	16,3	48,1
	25	20,4	60,0	25	20,4	60,0	25	20,4	60,0	25	20,4	60,0	25	20,4	60,0
	5	16,3	48,1	5	16,3	48,1	5	16,3	48,1	5	16,3	48,1	5	16,3	48,1
Tempo total sessão: 50 min			Tempo total sessão: 55 min			Tempo total sessão: 55 min			Tempo total sessão: 60 min			Tempo total sessão: 60 min			
3ª Semana de treino	Dia 1			Dia 2			Dia 3			Dia 4			Dia 5		
	Temp (min)	Vel (m/min)	% Vel _{Máx}	Temp (min)	Vel (m/min)	% Vel _{Máx}	Temp (min)	Vel (m/min)	% Vel _{Máx}	Temp (min)	Vel (m/min)	% Vel _{Máx}	Temp (min)	Vel (m/min)	% Vel _{Máx}
	5	12,9	38,0	5	12,9	38,0	5	12,9	38,0	5	12,9	38,0	5	12,9	38,0
	5	16,3	48,1	5	16,3	48,1	5	16,3	48,1	5	16,3	48,1	15	18,3	53,9
	10	18,3	53,9	10	18,3	53,9	10	18,3	53,9	10	18,3	53,9	40	20,4	60,0
	35	20,4	60,0	35	20,4	60,0	40	20,4	60,0	40	20,4	60,0	–	–	–
	5	16,3	48,1	5	16,3	48,1	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Tempo total sessão: 60 min			Tempo total sessão: 60 min			Tempo total sessão: 60 min			Tempo total sessão: 60 min			Tempo total sessão: 60 min			
4ª Semana treino	Dia 1			Dia 2			Dia 3			Dia 4			Dia 5		
	Temp (min)	Vel (m/min)	% Vel _{Máx}	Temp (min)	Vel (m/min)	% Vel _{Máx}	Temp (min)	Vel (m/min)	% Vel _{Máx}	Temp (min)	Vel (m/min)	% Vel _{Máx}	Temp (min)	Vel (m/min)	% Vel _{Máx}
	5	12,9	38,0	5	12,9	38,0	5	12,9	38,0	5	12,9	38,0	5	12,9	38,0
	50	20,4	60,0	50	20,4	60,0	50	20,4	60,0	50	20,4	60,0	50	20,4	60,0
	5	12,9	38,0	5	12,9	38,0	5	12,9	38,0	5	12,9	38,0	5	12,9	38,0
Tempo total sessão: 60 min			Tempo total sessão: 60 min			Tempo total sessão: 60 min			Tempo total sessão: 60 min			Tempo total sessão: 60 min			

Tabela modelo para progressão do treinamento em esteira rolante durante quatro semanas de treinamento. Descrição do tempo em minutos, velocidade em m/min e %Velocidade máxima adquirida.

13.3..Documento com registro da aprovação do comitê de ética da FMUSP para pesquisa com animais no presente estudo.

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Avenida Dr. Arnaldo, 455 Pacaembu – São Paulo – SP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificamos que a proposta intitulada **“Caracterização da função cardíaca em modelo de caquexia induzida pelo câncer: efeitos da atividade física voluntária”**, registrada com o nº **115/16**, sob a responsabilidade de **Patricia Chakur Brum** e **Larissa Gonçalves Fernandes**, apresentado pelo Programa Fisiopatologia Experimental - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP em reunião de 09.11.16

Finalidade	☐ Ensino ☒ Pesquisa Científica
------------	---

Vigência da autorização	Início: 01-07-2016 Término: 01-07-2018
Espécie/linhagem/raça	Camundongo C57BL/C6
Nº de animais	40
Peso/Idade	2-3 semanas
Sexo	macho
Origem	Biotério UNIFESP

CEUA-FMUSP, 09 de Novembro de 2016

Dr. Eduardo Pompeu Coordenador

Comissão de Ética no Uso de Animais

13.4.. Documento com registro da aprovação do comitê de ética da EEFE-USP para pesquisa com animais no presente estudo.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE EDUCAÇÃO FÍSICA E ESPORTE

USP

Of. CEUA/1714/EEFE/031214

Senhor(a) Pesquisador(a)

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo, aprovou ad-referendum o Protocolo de Pesquisa nº 2014/08 – Contribuição da atividade física aeróbica voluntária sobre os mediadores da caquexia induzida pelo câncer em camundongos.

Solicitamos a observância da apresentação do relatório parcial em fevereiro de 2016 e relatório final da pesquisa em fevereiro de 2017.

Atenciosamente,

Prof. Dra. Edliamar Menezes de Oliveira
Coordenadora

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

Av. Professor Mario Moraes, 85
CEP 05508-030 - São Paulo - SP - Brasil
Fone/fax: 55 11 3091-3247