

EDSON ALVES DE LIMA JUNIOR

**RESPOSTA DO TRATAMENTO COM METFORMINA E DO EXERCÍCIO
FÍSICO AERÓBIO NA MITIGAÇÃO DOS DISTÚRBIOS MUSCULARES
INDUZIDOS PELA DOXORRUBICINA**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia de Sistemas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do grau de doutor em Ciências.

São Paulo

2020

EDSON ALVES DE LIMA JUNIOR

**RESPOSTA DO TRATAMENTO COM METFORMINA E DO EXERCÍCIO
FÍSICO AERÓBIO NA MITIGAÇÃO DOS DISTÚRBIOS MUSCULARES
INDUZIDOS PELA DOXORRUBICINA**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia de Sistemas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do grau de doutor em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular, Tecidual e do Desenvolvimento

Orientador: Prof^o Dr. José Cesar Rosa Neto

Versão corrigida

São Paulo

2020

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Lima Junior, Edson Alves de
Resposta do tratamento com metformina e do
exercício físico aeróbio na mitigação dos distúrbios
musculares induzidos pela doxorrubicina / Edson
Alves de Lima Junior; orientador José Cesar Rosa
Neto. -- São Paulo, 2020.
136 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) --
Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências
Biomédicas.

1. Doxorrubicina. 2. Carcinoma de pulmão Lewis.
3. Exercício físico. 4. Metformina. 5. Músculo
esquelético. I. Rosa Neto, José Cesar, orientador.
II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a):

Título da Dissertação/Tese:

Orientador:

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a):

() **Aprovado(a)** () **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

Examinador(a): Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

Examinador(a): Assinatura:.....
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeito do treinamento físico aeróbio associado ao tratamento quimioterápico com doxorubicina em camundongos com carcinoma de pulmão Lewis (LLC). Papel da adiponectina no músculo estriado esquelético e no tumor.", protocolada sob o CEUA nº 4808050320, sob a responsabilidade de **José Cesar Rosa Neto e equipe; Edson Alves de Lima Junior** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo) (CEUA-ICB/USP) na reunião de 24/08/2020.

We certify that the proposal "Effect of aerobic exercise training associated with doxorubicin chemotherapy in mice with Lewis lung carcinoma (LLC). Role of adiponectin in skeletal muscle and tumor.", utilizing 75 Isogenics mice (75 males), protocol number CEUA 4808050320, under the responsibility of **José Cesar Rosa Neto and team; Edson Alves de Lima Junior** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Biomedical Sciences Institute (University of São Paulo) (CEUA-ICB/USP) in the meeting of 08/24/2020.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: [48 meses](#)

Depto/Setor: [Biologia Celular E do Desenvolvimento](#)

Origem: [Biotério Central FMUSP](#)

Espécie: [Camundongos isogênicos](#)

sexo: [Machos](#)

Idade ou peso: [8 a 10 semanas](#)

Linhagem: [C57Bl/6](#)

N amostral: [75](#)

São Paulo, 25 de outubro de 2020



Profa. Dra. Luciane Valéria Sita

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)



Dr. Alexandre Ceroni

Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)



CERTIFICADO

Certificamos que a solicitação de licença de uso de animais intitulada "*Efeito do treinamento físico aeróbio associado ao tratamento quimioterápico com doxorubicina em camundongos com carcinoma de pulmão Lewis (LLC). Papel da adiponectina no músculo estriado esquelético e tumor*", registrada sob nº 96, nas fls. , do livro 3, foi analisada e aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-ICB/USP) em 25/08/2015.

Por esta licença, estão autorizados a manipular animais dentro dos limites do projeto proposto e no âmbito da Lei Federal nº 11.794, o Dr.(Dra.) **José Cesar Rosa Neto** (Investigador Principal) e os membros da equipe: *Edson Alves de Lima Junior, Alexandre Abilio de Souza Teixeira, Camila Oliveira de Souza, Helena Angélica Batatinha, Luana Amorim Biondo, Adriane Pereira Fernandes Araújo*. Esta licença de uso de animais expira em 25/08/2019.

Havendo interesse na renovação da proposta, a solicitação deverá ser protocolada pela secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após essa data, uma nova proposta deverá ser encaminhada.

CERTIFICATE

We hereby certify that permission for the use of animals was granted to the research proposal "*Effect of aerobic exercise training associated with chemotherapy with doxorubicin in mice with Lewis lung carcinoma (LLC). Role of adiponectin in skeletal muscle and tumor*", registered as **Number 96**, in pages , of book 3, by the local ETHICS COMMITTEE ON THE USE OF ANIMALS (CEUA-ICB/USP) in 8/25/2015.

Under this license, **José Cesar Rosa Neto** (Principal Investigator) and team members *Edson Alves de Lima Junior, Alexandre Abilio de Souza Teixeira, Camila Oliveira de Souza, Helena Angélica Batatinha, Luana Amorim Biondo, Adriane Pereira Fernandes Araújo* are authorized to make use of animals within the limits of the research proposal presented to this committee and of the Brazilian Federal Law nº 11.794.

This license expires in 8/25/2019. In case the investigators wish to renew this license, this must be presented to CEUA-ICB/USP before the last day of validity of the present license. After such date, a new research proposal must be presented.

São Paulo, 27 de agosto de 2015.

Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes
Coordenador CEUA-ICB/USP

Eliane Aparecida G. M. Nascimento
Secretária CEUA-ICB/USP



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **05** nas fls. **15** do livro **03** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Jose Cesar Rosa Neto**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Efeito da doxorrubicina sobre distúrbios metabólicos no tecido adiposo e o possível papel adjuvante da metformina*" do qual participam o(s) aluno(s) **Edson Alves de Lima Junior, Luana Amorim Biondo**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)* em **10.03.2014, com validade de 4 anos.**

São Paulo, 12 de março de 2014.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador-CEUA- ICB/USP

Profa. Dra. ANA PAULA LEPIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP

Dedico este trabalho à minha família

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao professor Dr. José Cesar Rosa Neto. Pelo apoio e amizade ao longo de todo este processo. Sem dúvida uma das pessoas que mais influenciaram minha forma de ver o mundo. Obrigado por me acolher desde o período de iniciação científica e acreditar no potencial de seus alunos.

Aos amigos do laboratório de Imunometabolismo. Agradeço ao Xandy, Camila, Luana, Loreana, Tiego, Helena, Jefferson, Carol, Lucas, Geovana, Rafael, Karen, Francielle por proporcionar um ótimo ambiente para se trabalhar.

Também agradeço à nossa técnica Adriane Pereira pelo profissionalismo, seriedade e tranquilidade.

A todos os professores que contribuíram para minha formação em especial aos professores Dr. Fábio Santos de Lira, Dr. William Tadeu Lara Festuccia, Dr^a Marília Cerqueira Seelander, Dr^a Fernanda Ortiz e suas respectivas equipes pela colaboração durante todo o projeto.

Ao grupo de Bioquímica e Biologia Molecular do Câncer (Dr. Josep M^a Argilés, Francisco J. López-Soriano e Dr^a Sílvia Busquets e equipe) por me acolher durante o estágio na universidade de Barcelona.

Aos funcionários do ICB pelo suporte, em especial à secretaria da pós-graduação e do departamento de Pós-Graduação em Biologia de Sistemas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

AGRADECIMENTO À AGÊNCIA DE FOMENTO

Este trabalho foi desenvolvido no laboratório de Imunometabolismo do Instituto de Ciências Biomédicas (São Paulo, Brasil) com o auxílio financeiro da FAPESP, processos nº 2015/17068-2, 2019/01244-7, 2013/09367-4 e 2019/09854-9.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão das bolsas e apoio financeiro essenciais para a elaboração deste trabalho. Agradecemos também à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ).

RESUMO

LIMA JUNIOR, E. A. **Resposta do tratamento com metformina e do exercício físico aeróbio na mitigação dos distúrbios musculares induzidos pela doxorrubicina.** 2020. 136f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Tecidual) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

A administração da doxorrubicina tem sido amplamente empregada no tratamento do câncer. Porém seu uso é limitado devido à manifestação de efeitos colaterais adversos como a perda muscular. Embasado na evidência de que muitos tipos de câncer são tratados com este quimioterápico, o objetivo do presente trabalho foi investigar o efeito de estratégias que potencialmente seriam capazes de minimizar os distúrbios musculares promovidos por esta antraciclina. Para isto camundongos C57BL/6 receberam solução salina (CT) ou foram submetidos ao tratamento com doxorrubicina (DOX) por 6 semanas. O grupo DOX foi ainda subdividido em animais que realizaram exercício físico aeróbio em esteira (DOX+EXER) ou receberam metformina (DOX+MET). A combinação com o exercício físico elevou a atividade de AMPk no músculo gastrocnêmio, melhorou o desempenho físico em esteira e protegeu contra o aumento de corticosterona. Já a associação com metformina apenas normalizou a concentração de corticosterona. Posteriormente investigamos o efeito da associação do exercício físico aeróbio à um curto período de tratamento com doxorrubicina em camundongos portadores de tumor, estabelecendo o efeito da interrupção da quimioterapia no músculo esquelético. Uma semana após o estabelecimento do carcinoma de pulmão Lewis (LLC), parte dos animais foi submetido ao tratamento quimioterápico isolado com doxorrubicina (LLC+DOX) ou submetidos à quimioterapia combinada com exercício aeróbio (LLC+DOX+EXER). A eutanásia ocorreu ao fim do ciclo quimioterápico ou uma semana após a última administração de doxorrubicina. Com a interrupção do tratamento quimioterápico, o exercício físico minimizou a retomada da taxa de crescimento do tumor, evitou a perda muscular tardia e impediu o aumento na expressão de proteínas envolvidas no catabolismo muscular (MuRF1, Atrogin1, Miostatina e FoxO) em relação ao tratamento isolado com doxorrubicina. Os resultados obtidos indicam que a combinação do exercício físico aeróbio durante o tratamento com doxorrubicina reverteu parcialmente os efeitos adversos deste quimioterápico, resultando em proteção contra a perda do desempenho muscular e normalização da concentração de corticosterona, este último também observado com a metformina. Efeitos mais consistentes foram encontrados com a continuidade do exercício físico após a interrupção da quimioterapia que, mesmo na presença do tumor, minimizou a perda muscular por meio da diminuição do catabolismo, reduziu a retomada do crescimento do tumor e evitou a redução da sobrevida.

Paravras-chave: Doxorrubicina. Carcinoma de pulmão Lewis. Exercício físico. Metformina. Músculo esquelético.

ABSTRACT

LIMA JUNIOR, E. A. **Response to treatment with metformin and endurance exercise in mitigating muscle disorders induced by doxorubicin therapy.** 2020. 136f. Ph.D. thesis (Cell and Tissue Biology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

The administration of doxorubicin has been widely used in the treatment of cancer. However, its use is limited due to the manifestation of adverse side effects such as muscle loss. Based on the evidence that many types of cancer are treated with this chemotherapy, the aim of the present study was to investigate the effect of strategies that could potentially be able to minimize muscle disorders caused by this anthracycline. For this, C57BL / 6 mice received saline solution (CT) or were submitted to treatment with doxorubicin (DOX) for 6 weeks. The DOX group was further subdivided into animals that performed endurance exercise on treadmill (DOX + EXER) or received metformin (DOX + MET). The combination with endurance exercise increased AMPk activity in the gastrocnemius muscle, improved physical performance on treadmill and protected against the increase in corticosterone. The association with metformin only normalized the concentration of corticosterone. Subsequently, we investigated the effect of the association of endurance exercise in a short period of treatment with doxorubicin in mice with tumor, establishing the effect of the interruption of chemotherapy on skeletal muscle. One week after the establishment of Lewis lung carcinoma (LLC group), part of the animals were subjected to chemotherapy treatment with doxorubicin (LLC + DOX) or subjected to chemotherapy combined with endurance exercise (LLC + DOX + EXER). Euthanasia occurred at the end of the chemotherapy cycle or one week after the last administration of doxorubicin. With the interruption of chemotherapy treatment, endurance exercise minimized the resumption of tumor growth rate, decreased the muscle loss and prevented the increased expression of proteins involved in muscle catabolism (MuRF1, Atrogin1, Myostatin and FoxO) in relation to the isolated treatment with doxorubicin. The results obtained indicate that the combination of endurance exercise during treatment with doxorubicin partially reversed the adverse effects of this chemotherapy, resulting in protection against the loss of muscle performance and normalization of the corticosterone concentration. More consistent effects were found with the continuity of endurance exercise after the interruption of chemotherapy, which, even in the presence of the tumor, minimized muscle loss by decreasing catabolism, reduced the resumption of tumor growth and prevented reduced survival.

Key words: Doxorubicin. Lewis Lung Carcinoma. Endurance exercise. Metformin. Skeletal muscle.

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Sequências dos <i>primer's</i> do RT-PCR | 48 |
| Tabela 2. A doxorubicina causa severa perda de tecido adiposo e de músculo esquelético | 52 |
| Tabela 3. Efeito da doxorubicina e associações sobre parâmetros séricos | 53 |
| Tabela 4. Concentração de citocinas pró e anti-inflamatórias no músculo gastrocnêmio imediatamente ao tratamento quimioterápico..... | 67 |
| Tabela 5. Concentração de citocinas pró e anti-inflamatórias no homogenato tumoral imediatamente e após interrupção do tratamento quimioterápico. | 72 |
| Tabela 6. Parâmetros séricos..... | 73 |
| Tabela 7. Concentração sérica de glicose e insulina | 73 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Diagrama dos hallmarks do câncer..... | 20 |
| Figura 2. Modelo esquemático demonstrando a farmacodinâmica da doxorrubicina em uma célula tumoral..... | 23 |
| Figura 3. Contribuição e interação de diferentes sistemas proteolíticos durante a atrofia muscular..... | 26 |
| Figura 4. Principais vias de sinalização envolvidas no desenvolvimento da atrofia muscular induzidas por doxorrubicina..... | 29 |
| Figura 5. Influência do exercício físico nos hallmarks do câncer..... | 32 |
| Figura 6. Efeitos indiretos e diretos da metformina durante o câncer..... | 34 |
| Figura 7. Disposição dos camundongos para execução do protocolo experimental 1. | 40 |
| Figura 8. Representação do protocolo experimental 1..... | 40 |
| Figura 9. Disposição dos camundongos para execução do protocolo experimental 2. | 42 |
| Figura 10. Representação do protocolo experimental 2..... | 42 |
| Figura 11. O tratamento com doxorrubicina diminui o peso corporal..... | 51 |
| Figura 12. Efeito da doxorrubicina na expressão de proteínas ligadas ao desenvolvimento da proteólise..... | 52 |
| Figura 13. Exercício físico aeróbico e metformina reduzem o efeito da doxorrubicina sobre a corticosterona circulante..... | 54 |
| Figura 14. O exercício aeróbico impede a redução da velocidade máxima no teste em esteira causada pela doxorrubicina..... | 54 |
| Figura 15. Efeito da doxorrubicina e associações na área de secção transversa do músculo gastrocnêmio. | 55 |
| Figura 16. Efeito na expressão de AMPk no músculo gastrocnêmio. | 56 |
| Figura 17. Efeitos dos tratamentos sobre a síntese proteica no músculo gastrocnêmio | 57 |
| Figura 18. Efeito do exercício físico e metformina durante o tratamento quimioterápico na expressão de proteínas envolvidas na autofagia. | 58 |
| Figura 19. Efeito da combinação do exercício físico moderado ao tratamento com doxorrubicina na sobrevivência de camundongos..... | 59 |

| | |
|---|----|
| Figura 20. Peso corporal e do músculo esquelético de camundongos submetidos ao tratamento com doxorubicina combinado ou não com exercício físico | 60 |
| Figura 21. Desempenho no teste de esteira rolante de camundongos submetidos a quimioterapia associada ou não ao exercício físico | 62 |
| Figura 22. Efeito da combinação do exercício físico ao tratamento com doxorubicina na expressão de proteínas ligadas à proteólise muscular..... | 64 |
| Figura 23. Avaliação da síntese proteica imediatamente e após a quimioterapia | 65 |
| Figura 24. Sinalização autofágica no músculo gastrocnêmio..... | 66 |
| Figura 25. Avaliação da expressão de pNF-κBp65 músculo esquelético..... | 67 |
| Figura 26. Efeito do tratamento quimioterápico com doxorubicina e da combinação ao exercício físico aeróbio no crescimento tumoral e na expressão de IL-6..... | 68 |
| Figura 27. Expressão de p53 no homogenato tumoral após a suspensão da quimioterapia..... | 69 |
| Figura 28. Avaliação da expressão gênica de proteínas transportadoras de doxorubicina imediatamente e após interrupção do tratamento quimioterápico..... | 70 |
| Figura 29. Efeito do tratamento com doxorubicina e da combinação ao exercício físico aeróbio na expressão de VEGF | 71 |
| Figura 30. Expressão gênica dos receptores de VEGF no tumor | 71 |
| Figura 31. Determinação da sensibilidade e tolerância à glicose durante o tratamento quimioterápico com doxorubicina combinado ou não ao exercício físico | 74 |
| Figura 32. Efeito da continuidade do exercício físico após a interrupção da quimioterapia em um modelo experimental de câncer..... | 75 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4E-BP1 - Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1
Akt - Proteína quinase B
AMPk - Proteína quinase atada por AMP
BNIP3 - BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3
CAT - Catalase
CSCs - Células-tronco tumorais
cDNA - DNA complementar
DNA - Ácido desoxirribonucleico
DOX - Doxorrubicina
DPOC - Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
ELISA - Ensaio de imunoabsorção enzimática
EDL - Músculo extensor longo dos dedos
ERO's - Espécies reativas de oxigênio
EXER – Exercício físico aeróbio moderado
FoxO - Forkhead box O
GAPH - Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GRE - Elemento responsivo a glicocorticóides
GPX1 - Glutathione peroxidase
GTT – Teste de tolerância à glicose
IGF1 - Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
IL - Interleucina
iTT: teste de tolerância à insulina
MET – Metformina
mTOR - Mammalian target of rapamycin
MuRF1 - Muscle RING finger 1
NCSCs - células não tronco-tumorais
NFKB1 - subunidade p105 do fator nuclear NF-kappa-B
NOS3 – Óxido nítrico sintase 3
NQO1 - NAD(P)H desidrogenase
PBS - Tampão salina fosfato
RNA - Ácido ribonucleico
RT-PCR - Reação em cadeia da polimerase da transcrição reversa em tempo real

SOD1 - Superóxido dismutase

TNF α - Fator de necrose tumoral α

TOP2A - Topoisomerase 2 alfa

TP53 - Proteína p53

VM \acute{a} x - Velocidade máxima obtida no teste em esteira

XDH - Xantina desidrogenase

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 19 |
| 1.1 Câncer..... | 19 |
| 1.2 O tratamento quimioterápico com doxorubicina..... | 21 |
| 1.3 Doxorubicina e músculo esquelético..... | 24 |
| 1.4 Regulação da proteólise durante o tratamento com doxorubicina..... | 26 |
| 1.5 Doxorubicina e exercício físico aeróbio..... | 29 |
| 1.6 Câncer e exercício físico..... | 30 |
| 1.7 Metformina e quimioterapia..... | 33 |
| 2. OBJETIVO | 37 |
| 2.1 Objetivos específicos..... | 37 |
| 3. MÉTODOS | 39 |
| 3.1 Animais..... | 39 |
| 3.2 Protocolo experimental..... | 39 |
| 3.2.1 <i>Protocolo experimental 1 – Efeito da metformina e do exercício físico aeróbio sobre a perda muscular induzida por doxorubicina</i> | 39 |
| 3.2.2 <i>Protocolo experimental 2 – Efeito da continuidade do exercício físico aeróbio após a quimioterapia em um modelo experimental de câncer</i> | 41 |
| 3.2.3 <i>Implante das células de carcinoma de pulmão Lewis (LLC)</i> | 42 |
| 3.2.4 <i>Composição corporal, ingestão alimentar e volume do tumor</i> | 44 |
| 3.2.5 <i>Protocolo de treinamento</i> | 44 |
| 3.2.6 <i>Histologia do músculo gastrocnêmio</i> | 45 |
| 3.2.7 <i>Avaliação dos parâmetros séricos</i> | 45 |
| 3.2.8 <i>Determinação da concentração de TNF-α, IL-10, IL-6, IL1ra, IL-1β, MCP-1 e VEGF</i> | 46 |
| 3.2.9 <i>Teste de tolerância à insulina</i> | 46 |
| 3.2.10 <i>Teste de tolerância à glicose</i> | 46 |
| 3.2.11 <i>Determinação da expressão gênica</i> | 47 |
| 3.2.12 <i>Avaliação da síntese proteica in vivo (SUnSET)</i> | 48 |
| 3.2.13 <i>Immunoblotting</i> | 49 |
| 4. RESULTADOS | 51 |
| 4.1 <i>Protocolo experimental 1 – Efeito da metformina e do exercício físico aeróbio sobre a perda muscular induzida por doxorubicina</i> | 51 |
| 4.2 <i>Protocolo experimental 2 – Efeito da continuidade do exercício físico aeróbio após a quimioterapia em um modelo experimental de câncer</i> | 59 |
| 5. DISCUSSÃO | 75 |

| | |
|---------------------------|-----|
| 6. CONCLUSÃO | 89 |
| REFERÊNCIAS | 90 |
| APÊNDICES | 114 |

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

O câncer é um importante problema de saúde pública. No mundo, em 2018, foi estimado que mais de 18 milhões de pessoas foram diagnosticadas com essa doença e que tenha levado à óbito mais de 9,6 milhões de indivíduos (BRAY; FERLAY; SOERJOMATARAM; SIEGEL *et al.*, 2018). No Brasil, a estimativa para o triênio 2020-2022 é de 309.230 mil novos casos de câncer para homens e 316.140 mil casos para mulheres (INCA, 2019).

Em nível mundial, os tipos de câncer que representam maior incidência em relação ao número total de novos casos são: câncer de pulmão (11.6%), câncer de mama (11.6%), próstata (7.1%) e câncer colorretal (6.1%). As maiores taxas de mortalidade em relação ao total de óbitos são observadas no câncer de pulmão (18.4%), câncer colorretal (9.2%), estômago (8.2%) e fígado (8.2%) (BRAY; FERLAY; SOERJOMATARAM; SIEGEL *et al.*, 2018).

O câncer é um termo genérico utilizado para referir-se a um conjunto de doenças que tem como principal característica o crescimento celular anômalo e a capacidade de gerar metástase (NIH, 2015). Apesar do câncer poder se manifestar a partir de diversos tipos celulares primários, é marcado por algumas características celulares comuns como: alta e contínua atividade proliferativa, ativação de mecanismos que levam à invasão e/ou metástases, resistência à morte celular, crescimento anormal e sustentado, angiogênese, metabolismo celular alterado, inflamação, instabilidade genômica e escape do sistema imunitário (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Células tumorais apresentam uma importante instabilidade genômica, o que acaba por apoiar a alta capacidade proliferativa, sobrevivência e crescimento celular (HANAHAN; WEINBERG, 2011).



Figura 1. Diagrama dos *hallmarks* do câncer (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

A massa tumoral é formada por um nicho altamente heterogêneo de tipos celulares que não se limita às células tumorais, mas também inclui células imunológicas, fibroblastos, estruturas vasculares e outros (HANAHAN; WEINBERG, 2011). A dinâmica entre elas torna o microambiente tumoral um local altamente complexo (MARKS; OLSON; FERNANDEZ-ZAPICO, 2016; NORTHCOTT; NORTHEY; BARNES; WEAVER, 2015; WEBER; KUO, 2012). Células tumorais podem produzir fatores de crescimento e quimioatração que recrutam e alteram a resposta de células pertencentes ao nicho tumoral, assim como estas últimas influenciam o comportamento das células cancerosas (WANG; LI; CANG; GUO, 2019; WHITESIDE, 2006; YUAN; JIANG; SUN; CHEN, 2016).

A manifestação e desenvolvimento do câncer resultam de fatores genéticos e ambientais, bem como da interação entre ambos (WHO, 2013). Dentre os fatores ambientais ligados ao aumento da prevalência de alguns tipos de câncer podemos citar o sedentarismo, tabagismo, hábitos alimentares, alcoolismo, exposição à radiação, entre outros (WU; ZHU; THOMPSON; HANNUN, 2018).

A cirurgia, radioterapia, quimioterapia, terapia hormonal e imunoterapia são recursos terapêuticos convencionalmente utilizados para o tratamento do câncer,

podendo estes serem utilizados de forma isolada ou combinada (MILLER; NOGUEIRA; MARIOTTO; ROWLAND *et al.*, 2019). O termo quimioterapia antineoplásica se refere ao uso de agentes citotóxicos utilizados no tratamento do câncer, e que, tem a capacidade de perturbar a proliferação celular e/ou ativar mecanismos de morte celular programada (DEVITA; CHU, 2008). Ainda que a quimioterapia seja uma eficiente estratégia para o controle da doença, no geral, acaba afetando também células saudáveis. Estas manifestações podem ocorrer concomitantemente ao tratamento da doença ou, apenas, tardiamente (HERSHMAN; MCBRIDE; EISENBERGER; TSAI *et al.*, 2008; LIPSHULTZ; LIPSITZ; SALLAN; DALTON *et al.*, 2005; LIPSHULTZ; MILLER; SCULLY; LIPSITZ *et al.*, 2012; LIPSHULTZ; SCULLY; LIPSITZ; SALLAN *et al.*, 2010).

1.2 O tratamento quimioterápico com doxorubicina

A doxorubicina é um agente quimioterápico utilizado no tratamento de uma grande variedade de neoplasias sólidas e hematológicas. Sintetizado na década de 70, a partir do metabólito da bactéria *streptomyces peucetius* var. *caesius*, este medicamento faz parte da família das antraciclinas, à qual também pertencem a epirrubicina, daunorrubicina e idarrubicina (HORTOBAGYI, 1997; RICHARDSON; JOHNSON, 1997).

É um quimioterápico amplamente empregado na prática clínica cuja ação tumoricida se dá através da: inibição da atividade da enzima topoisomerase II, formação de espécies reativas de oxigênio (ERO's), ativação de mecanismos de morte celular mediado por caspases e pelo aumento da interação da proteína p53 ao DNA (DAVIES; DOROSHOW, 1986; DEAVALL; MARTIN; HORNER; ROBERTS, 2012; PEREGO; CORNA; DE CESARE; GATTI *et al.*, 2001; TEWEY; ROWE; YANG; HALLIGAN *et al.*, 1984; WEINSTEIN; MIHM; BAUER, 2000)

A distribuição da doxorubicina nos compartimentos celulares é variável, sendo característico seu acúmulo no núcleo (TERASAKI; IGA; SUGIYAMA; SAWADA *et al.*, 1984). Possui grande afinidade com a molécula de DNA e, em condições de saturação, pode se intercalar com até 5 pares de bases de DNA (GIGLI; RASOANAIVO; MILLOT; JEANNESSON *et al.*, 1989; LAL; MAHAJAN; CHEN; CHOWBAY, 2010). A formação desse complexo compromete a replicação do DNA e a atividade de topoisomerase II, promovendo assim, especialmente em células com

alta capacidade proliferativa, a ativação de mecanismos de morte celular programada (PEREGO; CORNA; DE CESARE; GATTI *et al.*, 2001; TEWEY; ROWE; YANG; HALLIGAN *et al.*, 1984).

Não obstante, o aumento do estresse oxidativo é um importante mecanismo ligado à atividade antineoplásica desse quimioterápico, onde parte da produção de ERO's pode ser atribuída ao próprio ciclo redox da droga. Enzimas como NAD(P)H desidrogenase, xantina oxidase e óxido nítrico sintase endotelial conduzem a formação do radical semiquinona que, uma vez reoxidado, forma as ERO's. Adicionalmente, a conjugação desta antraciclina ao Fe^{III} leva à formação de ERO's (FANG; NAKAMURA; IYER, 2007; MINOTTI; MENNA; SALVATORELLI; CAIRO *et al.*, 2004).

Uma vez administrada, a doxorubicina se distribui muito rapidamente entre os tecidos, estando muitos de seus efeitos ligados ao resultado de administrações sucessivas (GREENE; COLLINS; JENKINS; SPEYER *et al.*, 1983; RAHMAN; CARMICHAEL; HARRIS; ROH, 1986). A meia vida terminal desse agente quimioterápico é de aproximadamente 24-36 horas (TACAR; SRIAMORNSAK; DASS, 2013).

O influxo de doxorubicina nas células ocorre sobretudo por difusão passiva, podendo haver cooperação da proteína SLC22A16 (LAL; WONG; JADA; XIANG *et al.*, 2007; SPEELMANS; STAFFHORST; DE KRUIJFF; DE WOLF, 1994). O acúmulo deste quimioterápico nas células depende também de sua dinâmica de efluxo. As principais ligadas ao efluxo de doxorubicina são: ABCB1, ABCC1, ABCC2, ABCG2, RALBP1 (DANTZIG; LAW; CAO; STARLING, 2001; FOLMER; SCHNEIDER; BLUM; HAFKEMEYER, 2007; NAGATA; KIJIMA; HATANAKA; ASAI *et al.*, 2002; YAGUE; HIGGINS; RAGUZ, 2004; YOUNG; CAMPLING; COLE; DEELEY *et al.*, 2001). Durante o desenvolvimento da resistência ao tratamento com doxorubicina, células tumorais apresentam aumento da expressão de ABCB1, ABCC1, ABCC2 e ABCG2 (ABUHAMMAD; ZIHLIF, 2013; RUGGERI; SCIACCHITANO; VITARELLI; TRIMARCHI *et al.*, 2006; SHEN; CHU; BENCE; BAILEY *et al.*, 2008).

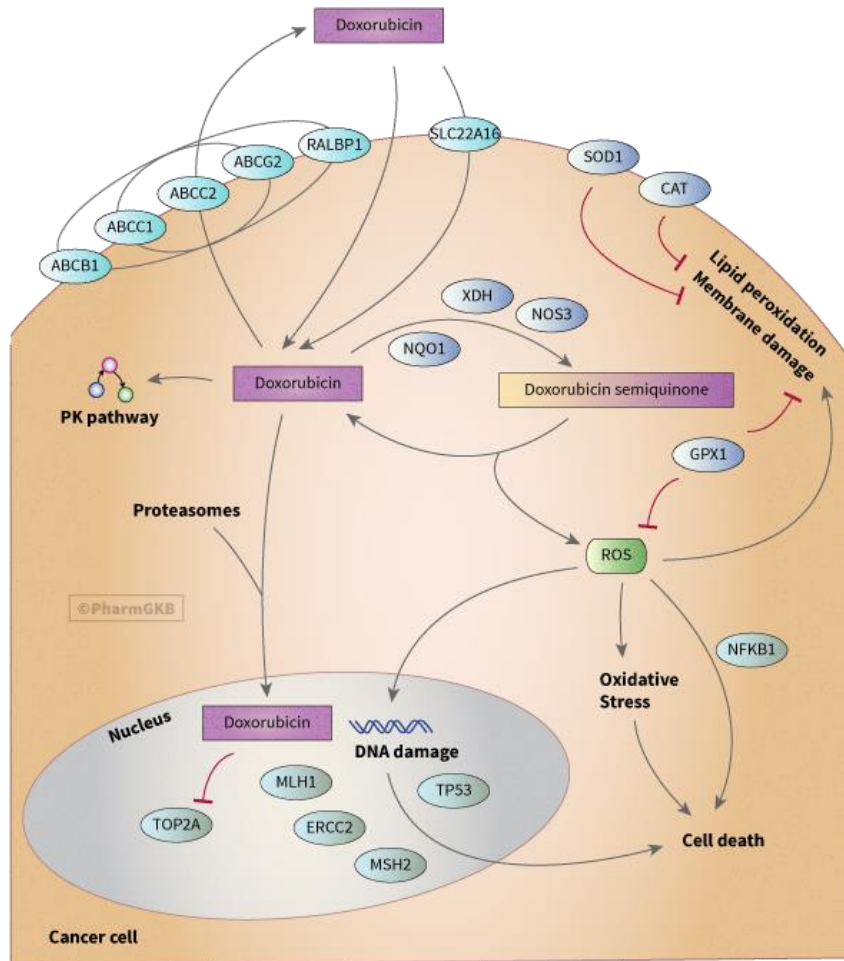


Figura 2. Modelo esquemático demonstrando a farmacodinâmica da doxorubicina em uma célula tumoral. As abreviações na figura correspondem a: proteína topoisomerase 2-alfa (TOP2A), espécies reativas de oxigênio (ROS), óxido nítrico sintase 3 (NOS3), enzima NAD(P)H desidrogenase (NQO1), enzima xantina desidrogenase (XDH), enzima glutatona peroxidase (GPX1), enzima catalase (CAT), enzima superóxido dismutase (SOD1), proteína p53 (TP53), subunidade p105 do fator nuclear NF-kappa-B (NFKB1) e de proteínas envolvidas com o influxo (SLC22A16), e efluxo (ABCB1, ABCC1, ABCC2, ABCG2, RALBP1) de doxorubicina pela célula tumoral. Mais detalhes no texto (THORN; OSHIRO; MARSH; HERNANDEZ-BOUSSARD et al., 2011).

Embora a eficiência desse quimioterápico no tratamento do câncer seja confirmada ao longo dos anos, seu uso é limitado devido aos evidentes efeitos colaterais adversos, dentre os quais estão a cardiotoxicidade, imunossupressão, nefrotoxicidade e hepatotoxicidade, além de prejuízos ao músculo esquelético (BENJAMIN; WIERNIK; BACHUR, 1974; FAHIM; KATAYA; EL-KHARRAG; AMER *et al.*, 2011; LOPES; MEISEL; DIRNAGL; CARVALHO *et al.*, 2008; SHI; MOON; DAWOOD; MCMANUS *et al.*, 2011).

1.3 Doxorrubicina e músculo esquelético

Historicamente, os efeitos da doxorrubicina vem sendo exaustivamente estudados no câncer e nos seus efeitos sobre o tecido cardíaco (EWER; VON HOFF; BENJAMIN, 2011; HORTOBAGYI, 1997; TACAR; SRIAMORNSAK; DASS, 2013). Entretanto, cada vez mais atenção tem sido direcionada ao impacto desta terapia no músculo esquelético.

Após administração, a concentração de doxorrubicina circulante cai muito rapidamente, sendo reflexo da sua distribuição para os tecidos (RAHMAN; CARMICHAEL; HARRIS; ROH, 1986). O músculo esquelético tem participação direta sobre a disponibilidade sistêmica desse quimioterápico após a administração inicial. Este tecido pode sequestrar a doxorrubicina e posteriormente liberá-lo na corrente sanguínea (FABRIS; MACLEAN, 2015). Se por um lado essa característica contribui para uma entrega subsequente de doxorrubicina e de seus metabólitos, ação importante para que os efeitos terapêuticos esperados ocorram, por outro lado, proporciona também citotoxicidade no músculo esquelético.

Múltiplas abordagens antineoplásicas, incluindo o tratamento quimioterápico, podem contribuir com a desregulação da homeostase do músculo esquelético (DAVIS; PANIKKAR, 2019). As alterações mais comuns relativas ao uso desta antraciclina no músculo esquelético são: atrofia muscular, alterações metabólicas, aumento do estresse oxidativo e o aumento da fadiga e fraqueza muscular (DE LIMA JUNIOR; YAMASHITA; PIMENTEL; DE SOUSA *et al.*, 2016; GILLIAM; ST CLAIR, 2011; GILLIAM; FISHER-WELLMAN; LIN; MAPLES *et al.*, 2013; MIN; KWON; SMUDER; WIGGS *et al.*, 2015; SMUDER; KAVAZIS; MIN; POWERS, 2011b).

Uma síndrome de origem multifatorial frequentemente encontrada em pacientes com câncer e fortemente associada ao aumento da mortalidade é a caquexia (BARACOS; MARTIN; KORC; GUTTRIDGE *et al.*, 2018). A caquexia associada ao câncer é caracterizada pela perda involuntária de peso, onde a patogênese da perda de massa muscular desempenha um papel central (ARGILES; BUSQUETS; STEMMLER; LOPEZ-SORIANO, 2014). Isto é sustentado graças ao aumento do dispêndio energético, anorexia, alterações metabólicas e inflamatórias provocadas pelo câncer (BARACOS; MARTIN; KORC; GUTTRIDGE *et al.*, 2018; PORPORATO, 2016). Muitos dos gatilhos para o desenvolvimento da perda muscular

pelo câncer e quimioterapia são comuns (BARRETO; MANDILI; WITZMANN; NOVELLI *et al.*, 2016).

Ensaio pré-clínicos têm demonstrado que alguns quimioterápicos isoladamente, incluindo a doxorrubicina, são suficientes para promover perda de massa muscular (DAMRAUER; STADLER; ACHARYYA; BALDWIN *et al.*, 2018; DE LIMA JUNIOR; YAMASHITA; PIMENTEL; DE SOUSA *et al.*, 2016; GARCIA; CATA; DOUGHERTY; SMITH, 2008). É evidente então que a perda muscular, além de resultar do próprio câncer, pode ser consequência do seu tratamento. E esta condição gera consequências negativas para a saúde do paciente. A diminuição da massa magra é um fator de risco independente para a maior toxicidade do tratamento quimioterápico e aumento da mortalidade (BARRET; ANTOUN; DALBAN; MALKA *et al.*, 2014; DALY; NI BHUACHALLA; POWER; CUSHEN *et al.*, 2018; JUNG; KIM; KIM; KIM *et al.*, 2015; MIYAMOTO; BABA; SAKAMOTO; OHUCHI *et al.*, 2015).

Parte da disfunção muscular promovida pela doxorrubicina é atribuído à danos oxidativos e ativação de vias catabólicas (GILLIAM; LARK; REESE; TORRES *et al.*, 2016; GILLIAM; FISHER-WELLMAN; LIN; MAPLES *et al.*, 2013; MIN; KWON; SMUDER; WIGGS *et al.*, 2015; SMUDER; KAVAZIS; MIN; POWERS, 2011b). O aumento do estresse oxidativo se deve à interrupção no fluxo de elétrons nos complexos proteicos mitocondriais levando assim ao aumento da produção de peróxido de hidrogênio (GILLIAM; LARK; REESE; TORRES *et al.*, 2016). Em paralelo, sabe-se que a doxorrubicina contribui com a redução da expressão da proteína de choque térmico HSP72 (SMUDER; KAVAZIS; MIN; POWERS, 2011b).

Além da perda muscular propriamente dita, um importante aspecto a ser considerado, e que tem importante impacto sobre a qualidade de vida de pacientes oncológicos, é a fadiga (BOWER, 2014). Muitas tarefas simples que dependem da capacidade funcional do indivíduo são afetadas. Atividades comuns do dia a dia, como as relacionadas à alimentação e cuidados próprios, tornam-se tarefas árduas (O'REGAN; MCCARTHY; O'REILLY; POWER *et al.*, 2019; SCHWARTZ, 2000). A fadiga muscular promovida pela doxorrubicina pode ser observada tanto em músculos respiratórios, quanto em músculos periféricos (ERTUNC; SARA; KORKUSUZ; ONUR, 2009; GILLIAM; MOYLAN; CALLAHAN; SUMANDEA *et al.*, 2011; HYDOCK; LIEN; JENSEN; SCHNEIDER *et al.*, 2011). A doxorrubicina pode influenciar diretamente a função das células musculares através da promoção de distúrbios no metabolismo de Ca^{2+} , gerando a redução da tensão máxima produzida e no aumento da fadiga (DE

BEER; FINKLE; VOEST; VAN HEIJST *et al.*, 1992; TARPEY; AMORESE; BALESTRIERI; FISHER-WELLMAN *et al.*, 2019; VAN NORREN; VAN HELVOORT; ARGILES; VAN TUIJL *et al.*, 2009). Além disso, o tratamento quimioterápico com doxorubicina causa diminuição da densidade capilar, o que contribui para redução da oferta de substratos e oxigênio para as fibras musculares (D'LUGOS; FRY; ORMSBY; SWEENEY *et al.*, 2019).

1.4 Regulação da proteólise durante o tratamento com doxorubicina

A regulação da massa muscular depende dos processos de síntese e degradação proteica (JACKMAN; KANDARIAN, 2004; SCHIAFFINO; DYAR; CICILIOT; BLAAUW *et al.*, 2013). Durante a perda muscular diferentes sistemas proteolíticos agem sincronicamente para promover a perda muscular (SCHIAFFINO; DYAR; CICILIOT; BLAAUW *et al.*, 2013). Sugere-se que durante o tratamento com doxorubicina ocorra aumento do catabolismo proteico pela ativação da via ubiquitina-proteassoma, ativação do sistema cálcio dependente (calpaínas), ativação das caspases e da autofagia (HIENSCH; BOLAM; MIJWEL; JENESON *et al.*, 2019).

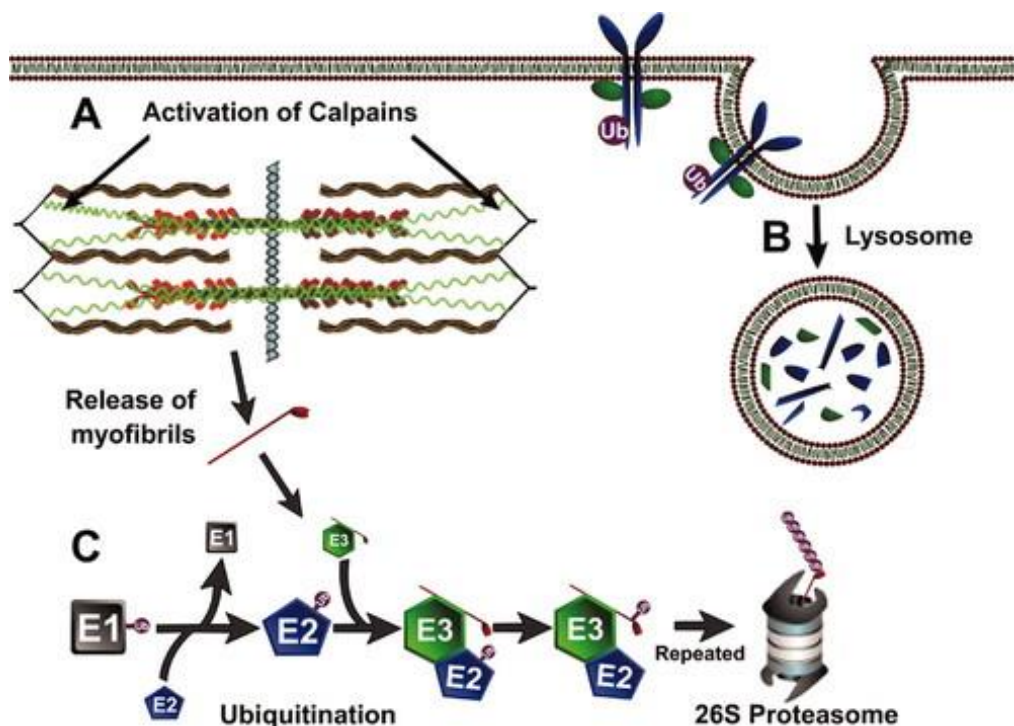


Figura 3. Contribuição e interação de diferentes sistemas proteolíticos durante a atrofia muscular. A. Sistema dependente da ativação de proteases ativadas por cálcio (calpaínas); B. Autofagia e proteólise lisossomal; C. Ativação do sistema ubiquitina-proteassoma dependente de ATP (JACKMAN; KANDARIAN, 2004).

A autofagia é um processo altamente regulado responsável pela remoção de organelas e agregados proteicos, essencial para a sobrevivência celular, mas que também pode contribuir com a proteólise muscular (DIKIC; ELAZAR, 2018; SANDRI, 2013). Conceitualmente, a macroautofagia pode ser dividida em diversas etapas (iniciação, nucleação da membrana, maturação da vesícula, e fusão com os lisossomos), com a doxorrubicina interferindo em algumas delas (YIN; PASCUAL; KLIONSKY, 2016).

Esse quimioterápico induz o aumento da expressão de Beclin-1 no músculo sóleo, importante proteína envolvida nos estágios iniciais da formação do autofagossomo (SMUDER; KAVAZIS; MIN; POWERS, 2011a). Adicionalmente, há o aumento da expressão de proteínas Atgs envolvidas na formação do autofagossomo, dentre as quais podemos citar Atg12, Atg7 e a formação do complexo Atg12-Atg5 (SMUDER; KAVAZIS; MIN; POWERS, 2011a). Por fim, conduz ao aumento da razão LC3II/LC3I, um importante marcador do processo de autofagia celular (SMUDER; KAVAZIS; MIN; POWERS, 2011a). Os autofagossomos, uma vez formados, podem ter seu conteúdo degradado através da fusão com vesículas lisossomais. Essas contêm proteases, dentre as quais, foi identificado o aumento da expressão de catepsina L, resultado do uso desta antraciclina (SMUDER; KAVAZIS; MIN; POWERS, 2011a).

Outro sistema proteolítico que a doxorrubicina pode regular positivamente é o dependente de calpaínas. A atividade deste sistema é dependente do cálcio livre citoplasmático e é responsável por promover a clivagem de proteínas estruturais e miofibrilares de forma intacta no sarcômero (GOLL; THOMPSON; LI; WEI *et al.*, 2003). Essas servem, então, como substratos para a degradação em outros sistemas proteolíticos. A miosina, actina, troponina I e α -actinina, por exemplo, apresentam maior afinidade à clivagem desta cisteíno-protease não lisossomal durante o estado oxidativo, como o proporcionado pelo uso da doxorrubicina (SMUDER; KAVAZIS; HUDSON; NELSON *et al.*, 2010). De fato, o aumento da atividade de calpaínas foi confirmado em modelos experimentais utilizando esse agente quimioterápico (YU; PEI; SIN; YIP *et al.*, 2014).

A ativação do sistema ubiquitina-proteassoma também tem importante papel no desenvolvimento da atrofia muscular (BILODEAU; COYNE; WING, 2016). Este sistema se caracteriza por ser um processo altamente organizado, responsável pela

seleção e identificação de proteínas que deverão ser degradadas no complexo do proteassoma.

A princípio, a enzima E1 (enzima ativadora da ubiquitina) promove a ligação covalente da ubiquitina à sua estrutura, em um processo dependente de energia. Em seguida, a ubiquitina é transferida para a enzima E2 (enzima conjugadora), formando o complexo E2-ubiquitina. Concomitantemente, a enzima E3 (ubiquitina ligase) identifica e se liga à proteína que deve ser direcionada ao proteassoma. Nesta etapa, a ubiquitina presente no complexo E2-ubiquitina é transferida para a proteína alvo, promovendo a ligação covalente do monômero de ubiquitina à proteína alvo. O resultado da repetição deste último evento acarreta na formação de uma proteína poliubiquitinada. Esta estrutura é identificada pelo complexo do proteassoma e conduzirá a degradação destas proteínas (GLICKMAN; CIECHANOVER, 2002; WING, 2005).

Uma característica da enzima E3 é que ela possui afinidade à substratos proteicos específicos. A Atrogin-1 (*Muscle Atrophy F-box*) e MuRF-1 (*Muscle Ring Finger-1*), por exemplo, são ubiquitinas E3-ligases seletivamente expressas no músculo esquelético e que apresentam grande importância na progressão da atrofia (BODINE; BAEHR, 2014; GUMUCIO; MENDIAS, 2013). Alguns estudos apontam que a expressão de MuRF-1 e Atrogin-1 aumentam durante a administração da doxorrubicina (HULMI; NISSINEN; RASANEN; DEGERMAN *et al.*, 2018; KAVAZIS; SMUDER; POWERS, 2014). Este aumento poderia ser atribuído, em parte, ao aumento da expressão de miostatina e da sinalização de FoxO 1/3 (KAVAZIS; SMUDER; POWERS, 2014).

Em adição, alguns estudos também sugerem que a doxorrubicina promova apoptose em miócitos. Acompanhado pelo aumento do número de fibras musculares com núcleo centralizado e aumento da fragmentação do DNA, a doxorrubicina regula positivamente a expressão de caspase-3 e proteínas pro-apoptóticas (MIN; KWON; SMUDER; WIGGS *et al.*, 2015; SIN; TAM; YU; YIP *et al.*, 2016; SMUDER; KAVAZIS; MIN; POWERS, 2011a; YU; PEI; SIN; YIP *et al.*, 2014).

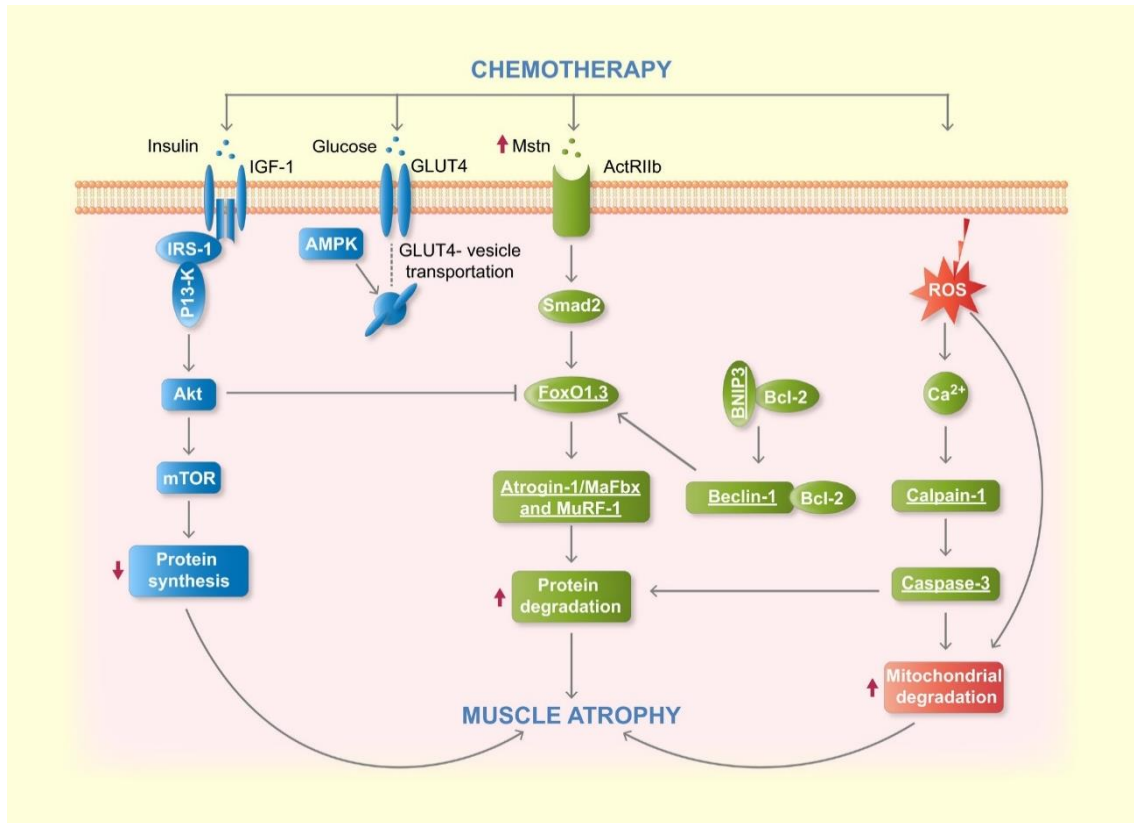


Figura 4. Principais vias de sinalização envolvidas no desenvolvimento da atrofia muscular induzidas por doxorrubicina. A administração de doxorrubicina é acompanhada pela ativação dos principais sistemas proteolíticos e por redução na síntese de proteínas (HIENSCH; BOLAM; MIJWEL; JENESON *et al.*, 2019).

Uma diversidade de estratégias tem sido utilizado para amenizar os efeitos deletérios da doxorrubicina, tais como alterações na dose terapêutica, modificações no sistema de entrega do quimioterápico ou associação com outros medicamentos (WENNINGMANN; KNAPP; ANDE; VAIDYA *et al.*, 2019). Como já supracitado, a doxorrubicina apresenta grande eficácia na indução da morte celular em diferentes tipos de células tumorais; torna-se, portanto, de extrema valia estratégias farmacológicas e não-farmacológicas que possam ser utilizadas de maneira combinada a fim de reduzir a toxicidade induzida por este quimioterápico.

1.5 Doxorrubicina e exercício físico aeróbio

O papel da atividade física no manejo de doenças crônicas degenerativas está relacionado à prevenção, atraso da progressão da doença quando esta já se estabeleceu, regulação da sintomatologia e proteção contra uma condição de incapacidade ou morte prematura (BOOTH; ROBERTS; LAYE, 2012; HOJMAN;

GEHL; CHRISTENSEN; PEDERSEN, 2018). A eficiência do exercício físico neste contexto irá depender do tipo de doença, assim como do estágio em que a enfermidade se encontra. Independentemente disto, o exercício físico pode ser considerado um importante fator para prevenção e tratamento de diversas doenças, incluindo o câncer, a DPOC, a diabetes, a doença renal crônica, e outras (BOOTH; ROBERTS; LAYE, 2012).

No tratamento do câncer, o uso do agente quimioterápico doxorrubicina contribui para a perda muscular e fadiga (GILLIAM; ST CLAIR, 2011; NISSINEN; DEGERMAN; RASANEN; POIKONEN *et al.*, 2016). Neste contexto, o exercício físico tem sido apontado como estratégia para minimizar esses efeitos (MENESES-ECHAVEZ; GONZALEZ-JIMENEZ; RAMIREZ-VELEZ, 2015; TIAN; LU; LIN; HU, 2016). Pacientes oncológicos em tratamento com doxorrubicina, e em combinações padronizadas de outros medicamentos, demonstram o aumento da fadiga, o qual pode ser revertida por meio de um programa regular de exercícios físicos (SCHWARTZ; MORI; GAO; NAIL *et al.*, 2001).

Isso seria possível em virtude do aumento da capacidade antioxidante, aumento da expressão de proteínas de choque térmico (HSP72) e potencial para reduzir o acúmulo intracelular do quimioterápico no músculo esquelético, e consequente redução da toxicidade (POWERS; DUARTE; LE NGUYEN; HYATT, 2019). Sugere-se que estas alterações são acompanhadas pela redução na sinalização dos principais sistemas proteolíticos (KAVAZIS; SMUDER; POWERS, 2014; SMUDER; KAVAZIS; MIN; POWERS, 2011a). Além disso, alguns estudos apontam que o exercício físico de endurance possa exercer efeito sinérgico ou ao menos não interferir negativamente na redução do crescimento tumoral provocado pela doxorrubicina (JONES; EVES; COURNEYA; CHIU *et al.*, 2005; MORRELL; ALVAREZ-FLOREZ; ZHANG; KLEINERMAN *et al.*, 2019; STURGEON; SCHADLER; MUTHUKUMARAN; DING *et al.*, 2014).

1.6 Câncer e exercício físico

O câncer é uma das principais causas de mortalidade e morbidade no mundo, e dentre os fatores de risco ambiental que contribuem para o desenvolvimento desta doença está a inatividade física (FERLAY; SOERJOMATARAM; DIKSHIT; ESER *et*

al., 2015; RUIZ-CASADO; MARTIN-RUIZ; PEREZ; PROVENCIO *et al.*, 2017; SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2018).

A atividade física está associada à menor prevalência de vários tipos de câncer, como câncer de cólon, endométrio, mama, próstata, gastroesofágico, de ovário, pancreático e pulmonar (RUIZ-CASADO; MARTIN-RUIZ; PEREZ; PROVENCIO *et al.*, 2017). A prática do exercício, durante e após o tratamento do câncer, tem demonstrado efeitos positivos com relação ao bem-estar e desempenho físico (ADAMSEN; QUIST; ANDERSEN; MOLLER *et al.*, 2009; COURNEYA; SELLAR; STEVINSON; MCNEELY *et al.*, 2009; VALLANCE; COURNEYA; PLOTNIKOFF; YASUI *et al.*, 2007). É também responsável pela redução da fadiga, uma das frequentes queixas de pacientes oncológicos (KESSELS; HUSSON; VAN DER FELTZ-CORNELIS, 2018; PUETZ; HERRING, 2012). Não obstante, estudos apontam um possível efeito inibitório do exercício físico sobre o crescimento tumoral, progressão metastática e vascularização tumoral (ESCHKE; LAMPIT; SCHENK; JAVELLE *et al.*, 2019; THOMPSON; WESTERLIND; SNEDDEN; BRIGGS *et al.*, 1995; ZIELINSKI; MUENCHOW; WALLIG; HORN *et al.*, 2004).

Apesar da importância da atividade física na redução da prevalência de alguns tipos de câncer e no atraso do desenvolvimento da doença, os mecanismos ainda não foram completamente elucidados. Sugere-se que esses efeitos sejam mediados por: redução da sinalização proliferativa sustentada das células tumorais, ativação de supressores de crescimento, ativação das vias de morte celular, normalização da vascularização tumoral e redução de mecanismos envolvidos na invasão e metástase tumoral (RUIZ-CASADO; MARTIN-RUIZ; PEREZ; PROVENCIO *et al.*, 2017). Além disso, também é sugerido a reprogramação metabólica de células tumorais e em alterações imunológicas e inflamatórias promovidas pelo exercício (MURPHY; ENOS; VELAZQUEZ, 2015).

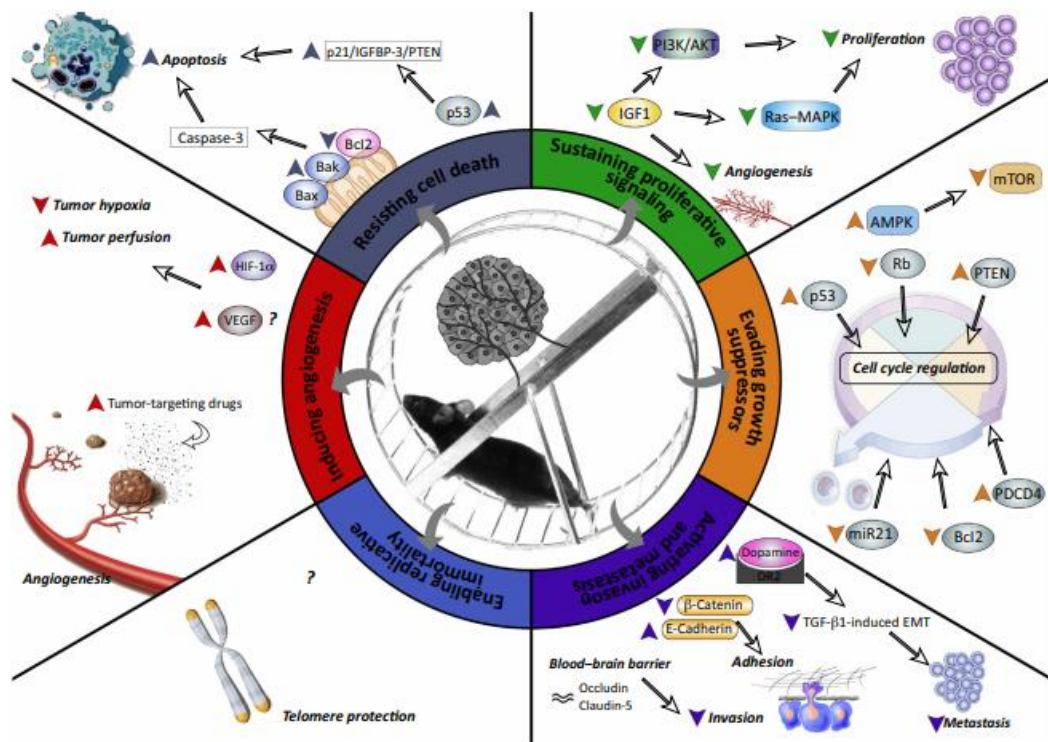


Figura 5. Influência do exercício físico nos *hallmarks* do câncer. O exercício físico promove alterações na sinalização proliferativa sustentada de células tumorais, propicia a ativação de supressores de crescimento e de morte celular, auxilia na normalização da vascularização tumoral e reduz a ativação de vias envolvidas na invasão e metástase tumoral (RUIZ-CASADO; MARTIN-RUIZ; PEREZ; PROVENCIO *et al.*, 2017).

Os mecanismos pelos quais o exercício exerce seus efeitos no corpo são multifacetados, incluindo alteração do balanço energético, alteração da adiposidade corporal, produção e secreção de hormônios e efeitos imunomodulatórios (MURPHY; ENOS; VELAZQUEZ, 2015). Por exemplo, o exercício físico contribui com a redução do crescimento tumoral e aumento da apoptose em células tumorais pela redução da atividade da proteína p53 via supressão do eixo de IGF-1 (LEUNG; ARONSON; NGO; GOLDING *et al.*, 2004). A inflamação é frequentemente ligada ao desenvolvimento e progressão do câncer (COUSSENS; WERB, 2002). Por outro lado, o exercício físico moderado proporciona um efeito anti-inflamatório sistêmico (MURPHY; ENOS; VELAZQUEZ, 2015; PETERSEN; PEDERSEN, 2005).

O músculo esquelético representa uma grande porcentagem do peso corporal de indivíduos saudáveis e, além da sua evidente função mecânica, possui também importante papel na produção de fatores capazes de regular a homeostase corporal, muitos dos quais tem sua produção estimulada a partir da contração muscular. Estas proteínas são coletivamente chamadas de miocinas e possuem importantes funções

metabólicas e inflamatórias, podendo agir local ou sistemicamente (PEDERSEN, 2011a; b). Parte dos efeitos benéficos do exercício físico como estratégia auxiliar às terapias convencionais utilizadas no câncer podem ser associadas à ação da IL-6. Esta miocina estabelece um importante crosstalk entre o músculo esquelético e diversos outros tecidos. A IL-6 derivada do músculo esquelético em contração, por exemplo, conduz à redistribuição de células natural killer (NK), auxiliando na supressão do crescimento tumoral (PEDERSEN; IDORN; OLOFSSON; LAUENBORG *et al.*, 2016).

A exposição de células de câncer de próstata ao soro de indivíduos exercitados reduz a taxa de crescimento celular (RUNDQVIST; AUGSTEN; STROMBERG; RULLMAN *et al.*, 2013). Apesar disso, o uso de soro em meio de cultura não permite diferenciar o que é resultado exclusivamente de substâncias humorais produzidas pelo músculo ou de alterações sistêmicas promovidas pelo exercício físico (decorrente de alterações na composição corporal, hormônios e sistema imunológico). Algumas iniciativas nesse sentido indicam que fatores produzidos diretamente pelo músculo esquelético contribuem para a remodelação da biologia tumoral. Foi identificado, à exemplo, que a oncostatina M e SPARC produzidas e liberadas após contração muscular contribuem com a inibição do crescimento de células de câncer de mama e cólon em cultura celular (AOI; NAITO; TAKAGI; TANIMURA *et al.*, 2013; HOJMAN; DETHLEFSEN; BRANDT; HANSEN *et al.*, 2011).

1.7 Metformina e quimioterapia

A metformina é um medicamento da família das biguanidas, amplamente utilizado para a normalização da glicemia (SETTER; ILTZ; THAMS; CAMPBELL, 2003). É usualmente prescrita para o tratamento do diabetes mellitus, diabetes gestacional e síndrome metabólica, embora também possa ser utilizado em outras doenças (BOLEN; FELDMAN; VASSY; WILSON *et al.*, 2007; CICERO; TARTAGNI; ERTEK, 2012; HOLMAN; PAUL; BETHEL; MATTHEWS *et al.*, 2008). Os efeitos comumente atribuídos ao uso deste fármaco incluem redução da concentração de glicose circulante, melhora da sensibilidade à insulina, redução da gliconeogênese hepática e redução de fatores de risco vascular (PERNICOVA; KORBONITS, 2014; SALPETER; BUCKLEY; KAHN; SALPETER, 2008). Parte dos efeitos supracitados

está associado à ativação da AMPk, muitos destes semelhantes aos promovidos pelo exercício físico aeróbio (WEIHRAUCH; HANDSCHIN, 2018).

Adicionalmente ao uso padrão da metformina, modelos experimentais e clínicos têm demonstrado que este medicamento pode ter um importante papel como terapia complementar no câncer (ANISIMOV; BERSTEIN; EGORMIN; PISKUNOVA *et al.*, 2005; KASZNICKI; SLIWINSKA; DRZEWOSKI, 2014; NIRLAULA; DOWLING; ENNIS; CHANG *et al.*, 2012). A hiperinsulinemia e hiperglicemia são importantes fatores de risco para o desenvolvimento do câncer, de forma que o uso deste medicamento acaba por contribuir com a redução da prevalência dessa enfermidade (GODSLAND, 2009; LI; ZHANG; SANG; ZHOU *et al.*, 2019). Esse efeito é observado, sobretudo, em pacientes diabéticos, onde o uso da metformina reduz a prevalência do câncer e a mortalidade para esta doença (CURRIE; POOLE; GALE, 2009; LANDMAN; KLEEFSTRA; VAN HATEREN; GROENIER *et al.*, 2010). Esta aplicabilidade da metformina advém de efeitos indiretos (insulino dependentes) e diretos (dependentes ou não da ativação de AMPk) proporcionado por este fármaco (KHEIRANDISH; MAHBOOBI; YAZDANPARAST; KAMAL *et al.*, 2018; KURELAC; UMESH GANESH; IORIO; PORCELLI *et al.*, 2020).

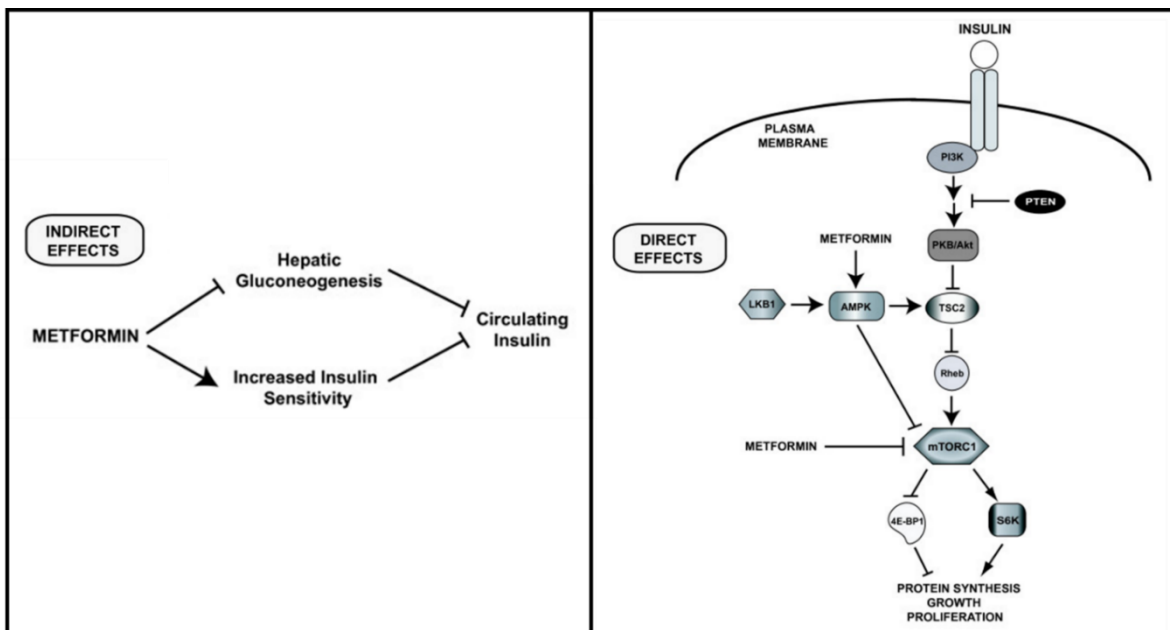


Figura 6. Efeitos indiretos e diretos da metformina durante o câncer. A metformina reduz a gliconeogênese hepática e melhora a sensibilidade à insulina. A menor insulinemia reduz a atividade tirosina quinase do receptor de insulina e conseqüente conduz a limitação da sinalização de PI3K. A metformina contribui com o aumento da atividade de AMPk que por mecanismos dependentes e independentes de TSC2 levam a inibição de mTOR. Efeitos diretos deste fármaco em mTOR podem também serem observados. Adaptado de DOWLING; GOODWIN e STAMBOLIC (2011).

A metformina possui uma meia vida plasmática de aproximadamente 5-6 horas (GRAHAM; PUNT; ARORA; DAY *et al.*, 2011). Após ser absorvida pelas células, através de um processo de difusão passiva ou auxiliada por transportadores de cátions orgânicos (OCT), parte dos efeitos metabólicos da metformina podem ser atribuídos à ativação da AMPk (CAI; EVERETT; THAKKER, 2019; CAI; ZHANG; HAN; EVERETT *et al.*, 2016). Este medicamento provoca alterações nas razões de AMP/ATP e ADP/ATP pela inibição do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial. A AMPk, por ser um importante sensor energético celular, é sensível a essas mudanças e tem sua atividade aumentada (OAKHILL; STEEL; CHEN; SCOTT *et al.*, 2011). Sugere-se também que a metformina possa estimular diretamente LKB-1/STK 11 (serina/treonina quinase 11), uma proteína *upstream* de AMPk (SHAW; LAMIA; VASQUEZ; KOO *et al.*, 2005).

Diferentes mecanismos tem sido relacionados aos efeitos antitumorais da metformina como a inibição da formação de espécies reativas de oxigênio e de mTORC1, ativação da AMPk, modulação do receptor de adenosina A1, redução da concentração circulante de insulina, IGF-1 e IGF-2 e diminuição da inflamação crônica (UGWUEZE; OGAMBA; YOUNG; ONYENEKWE *et al.*, 2020). Como terapia adjuvante ou neoadjuvante tem mostrado resultados promissores durante o câncer (COYLE; CAFFERTY; VALE; LANGLEY, 2016; SARAEI; ASADI; KAKAR; MORADI-KOR, 2019; UGWUEZE; OGAMBA; YOUNG; ONYENEKWE *et al.*, 2020).

Além de promover efeitos diretos sobre as células tumorais, a metformina pode agir como agente sensibilizante da quimioterapia padrão e evitar a resistência adquirida durante o tratamento (DAVIES; LOBANOVA; DAWICKI; GROOT *et al.*, 2017; QU; ZHANG; ZHENG; ZHANG *et al.*, 2014; ZHANG; GUO, 2016). No modelo experimental de câncer de pulmão de células não pequenas mutadas para KRAS/LKB1, a associação desta biguanida ao tratamento com cisplatina resultou em efeitos pró-apoptóticos nas células tumorais e diminuiu a resistência ao quimioterápico (MORO; CAIOLA; GANZINELLI; ZULATO *et al.*, 2018). De maneira semelhante, quando a metformina foi associada ao tratamento com doxorrubicina, houve melhora na eficiência terapêutica do agente antineoplásico e redução na taxa de recidiva tumoral (BLANDINO; VALERIO; CIOCE; MORI *et al.*, 2012; EL-ASHMAWY; KHEDR; EL-BAHRAWY; ABO MANSOUR, 2017; ILIOPOULOS; HIRSCH; STRUHL, 2011).

Em nível periférico, a metformina protege contra lesão renal aguda e a neuropatia periférica induzidas por gentamicina, oxaliplatina e cisplatina (EL-FATATRY; IBRAHIM; HUSSIEN; MOSTAFA, 2018; LI; GUI; REN; LIU *et al.*, 2016; MAO-YING; KAVELAARS; KRUKOWSKI; HUO *et al.*, 2014; MORALES; DETAILLE; PRIETO; PUENTE *et al.*, 2010). Durante o tratamento quimioterápico com doxorubicina, o uso profilático de metformina reduz a toxicidade e aumenta a sobrevida (ALHOWAIL; ALMOGBEL, 2019). Esta combinação ainda contribui com a redução da cardiotoxicidade, recuperação do metabolismo da glicose e redução da fibrose no tecido adiposo (AJZASHOKOUHI; BOSTAN; JOMEZADEH; HAYES *et al.*, 2020; BIONDO; BATATINHA; SOUZA; TEIXEIRA *et al.*, 2018; GRAHAM; PUNT; ARORA; DAY *et al.*, 2011; ZILINYI; CZOMPA; CZEGLEDI; GAJTKO *et al.*, 2018).

A doxorubicina prejudica a captação de glicose em miotubos via inibição da AMPk, bem como, já foi demonstrado que o uso desta antraciclina tem impacto negativo sobre o metabolismo e inflamação do músculo esquelético de animais diabéticos (DE LIMA JUNIOR; YAMASHITA; PIMENTEL; DE SOUSA *et al.*, 2016; SUPRIYA; TAM; PEI; LAI *et al.*, 2016). No entanto, ainda é obscuro o efeito da combinação da metformina ao tratamento com doxorubicina neste tecido.

A administração da doxorubicina tem sido amplamente empregada no tratamento do câncer. Porém seu uso é limitado devido à manifestação de efeitos colaterais adversos, que podem se manifestar mesmo após a finalização do ciclo quimioterápico. Com base na evidência de que muitos tipos de câncer seguem sendo tratados com doxorubicina, investigamos o efeito da combinação deste agente quimioterápico ao exercício físico e a metformina, avaliando os distúrbios musculares promovidos por esta antraciclina. Adicionalmente, em um modelo experimental de câncer, avaliamos o efeito da continuidade do exercício físico após o fim da quimioterapia sobre a progressão do catabolismo muscular e crescimento tumoral.

2. OBJETIVO

Avaliar os efeitos de uma abordagem farmacológica, e outra não farmacológica, nos distúrbios musculares induzidos pelo tratamento quimioterápico com doxorubicina.

2.1 Objetivos específicos

Inicialmente investigar se o exercício físico aeróbio ou a metformina protegeriam contra os efeitos deletérios da doxorubicina no músculo esquelético. Assim:

1. Determinar o efeito isolado da doxorubicina no desenvolvimento da atrofia muscular;
2. Avaliar se o exercício físico ou a metformina, combinados ao tratamento com doxorubicina, seriam capazes de minimizar os efeitos adversos provocados por este quimioterápico. Para isto, avaliamos em um modelo experimental sem tumor a síntese e a degradação proteica no músculo esquelético, a expressão de AMPk e determinamos o desempenho dos animais em esteira.

Em seguida, investigar o efeito da combinação do exercício físico ao tratamento com doxorubicina em camundongos com carcinoma de pulmão Lewis (LLC). Deste modo:

3. Avaliar o efeito da combinação do tratamento com doxorubicina ao exercício físico aeróbio moderado, identificando mudanças na perda muscular, desempenho físico, crescimento tumoral e sobrevida;
4. Determinar o efeito da interrupção da quimioterapia sobre a perda muscular, estabelecendo o papel da continuidade do exercício físico aeróbio neste contexto. Em razão disso, avaliamos imediatamente, e uma semana após o fim do ciclo quimioterápico vias de sinalização ligadas ao catabolismo muscular no músculo gastrocnêmio;

5. No carcinoma de pulmão Lewis, avaliar a expressão do supressor tumoral p53 e de proteínas envolvidas na inflamação, angiogênese e de resistência adquirida ao tratamento quimioterápico com doxorubicina.

3. MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos C57BL/6 com idade entre 8 e 10 semanas de vida. Os animais foram mantidos em sala com ciclo claro-escuro de 12-12 h e temperatura de $22 \pm 2^\circ \text{C}$, com dieta normal (ração Nuvital da Nuvilab, Colombo, PR) e água *ad libitum* durante o tratamento. Todos os procedimentos desse estudo seguiram os princípios éticos de experimentação animal sendo submetidos ao Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade de São Paulo.

3.2 Protocolo experimental

3.2.1 Protocolo experimental 1 – Efeito da metformina e do exercício físico aeróbio sobre a perda muscular induzida por doxorrubicina

Foram utilizados camundongos C57BL/6, os quais receberam doses intraperitoneais de cloridrato de doxorrubicina (DOX) (Eurofarma, Campinas, SP, Brasil. Lot 350552 A) na concentração de 2,5 mg/kg de peso corporal, duas vezes por semana até perfazer a concentração de 30 mg/kg peso corporal. O grupo controle (CT) recebeu o mesmo volume de salina (0,9%). O grupo DOX foi submetido ao exercício físico aeróbio moderado em esteira (DOX + EXER) 5 vezes na semana, ou recebeu metformina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) diariamente por gavagem na concentração de 300 mg/kg peso corporal (DOX + MET). Os animais não tratados com metformina receberam solução salina (0,9%) por gavagem. A Figura 7 representa a divisão dos grupos experimentais. Após 6 semanas, os camundongos foram submetidos à restrição alimentar de 6 horas e submetidos à eutanásia para a coleta das amostras. A Figura 8 representa o modelo esquemático do protocolo experimental. Os músculos e coxins adiposos foram pesados e armazenados à -80°C para as análises.

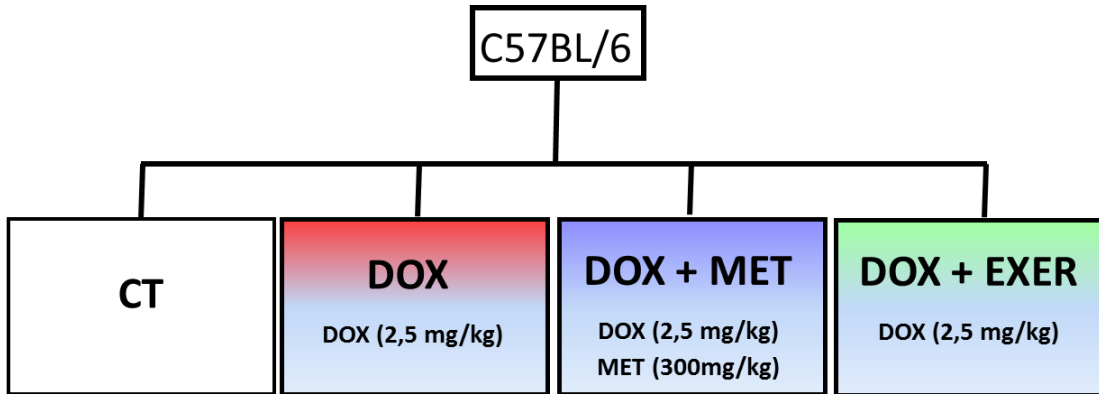


Figura 7. Disposição dos camundongos para execução do protocolo experimental 1. Grupo controle (CT); Grupo tratado com doxorrubicina (DOX); Grupo tratado com doxorrubicina combinado ao tratamento com metformina (DOX+MET); Grupo tratado com doxorrubicina combinado ao exercício físico aeróbio moderado (DOX+ EXER).

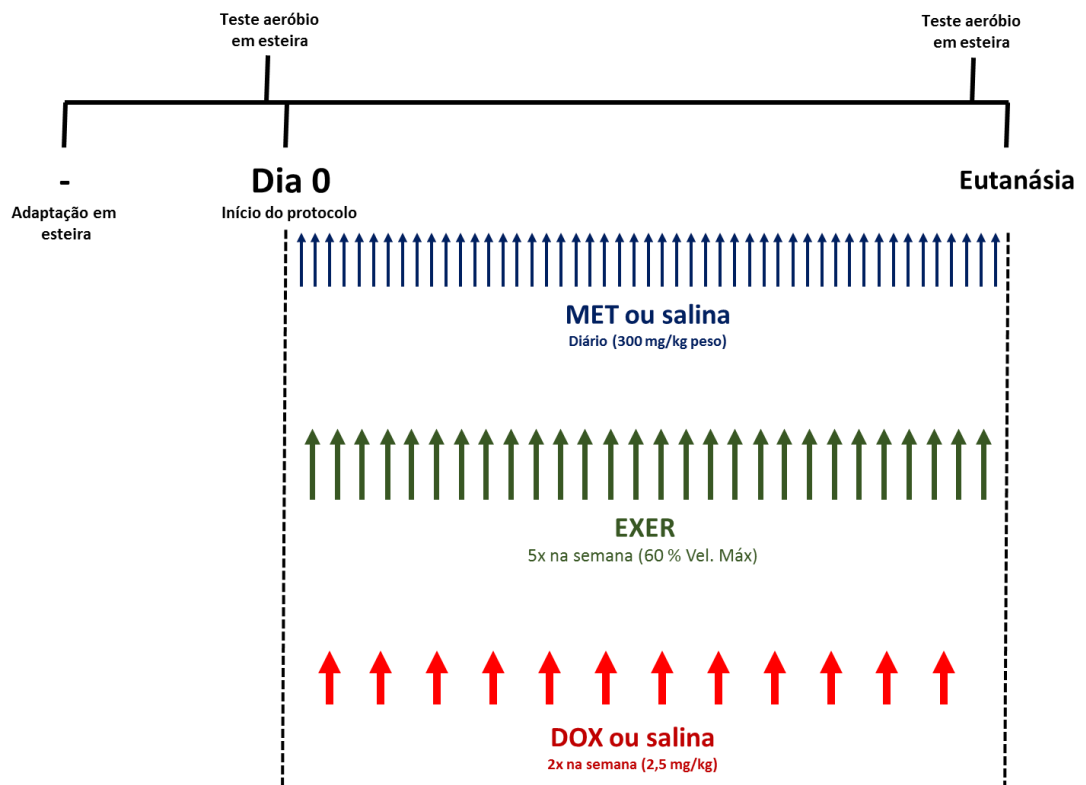


Figura 8. Representação do protocolo experimental 1.

3.2.2 Protocolo experimental 2 – Efeito da continuidade do exercício físico aeróbio após a quimioterapia em um modelo experimental de câncer

Camundongos C57BL/6 tiveram células de carcinoma de pulmão Lewis (LLC) inoculadas subcutaneamente no flanco direito. Uma semana após o estabelecimento do tumor, parte desses animais foram submetidos à administração intraperitoneal de doxorrubicina (LLC + DOX) ou combinação de exercício físico aeróbio moderado ao tratamento quimioterápico com doxorrubicina (LLC+ DOX + EXER). A administração de doxorrubicina ocorreu duas vezes por semana (concentração de 2,5 mg/kg peso corporal) até perfazer a concentração de 10 mg/kg peso corporal. O grupo LLC recebeu o mesmo volume de salina (0,9%). A Figura 9 representa a divisão dos grupos experimentais deste protocolo experimental. Para avaliar se havia persistência na perda muscular após a interrupção da quimioterapia os grupos de animais foram eutanasiados com 21 ou 28 dias. Entre a suspensão da doxorrubicina e o 28º dia, o grupo LLC + DOX + EXER continuou realizando exercício físico aeróbio em esteira. Após 21 dias (período imediato à quimioterapia) ou 28 dias (uma semana após o última administração quimioterápica), os camundongos foram submetidos a restrição alimentar de 6 horas e eutanasiados para a coleta de tecidos e sangue. Os músculos esqueléticos, tecidos adiposos e tumor foram pesados e armazenados em -80°C para análises posteriores. A Figura 10 representa o modelo esquemático do protocolo experimental. Adicionalmente aos grupos acima citados, utilizamos camundongos C57BL/6 sem tumor (CT) e camundongos C57BL/6 sem tumor tratados com doxorrubicina (DOX). Conforme exigido pelas diretrizes institucionais todos os animais foram eutanasiados previamente caso volume do tumor atingisse 1.500 mm³.

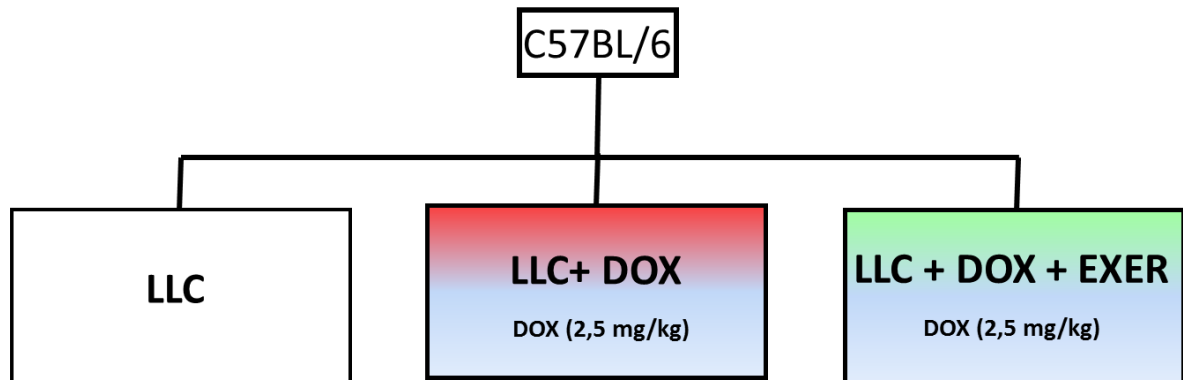


Figura 9. Disposição dos camundongos para execução do protocolo experimental 2. Grupo tumor (LLC); Grupo tratado com doxorubicina (DOX); Grupo tratado com doxorubicina combinado ao exercício físico aeróbio moderado (DOX + EXER).

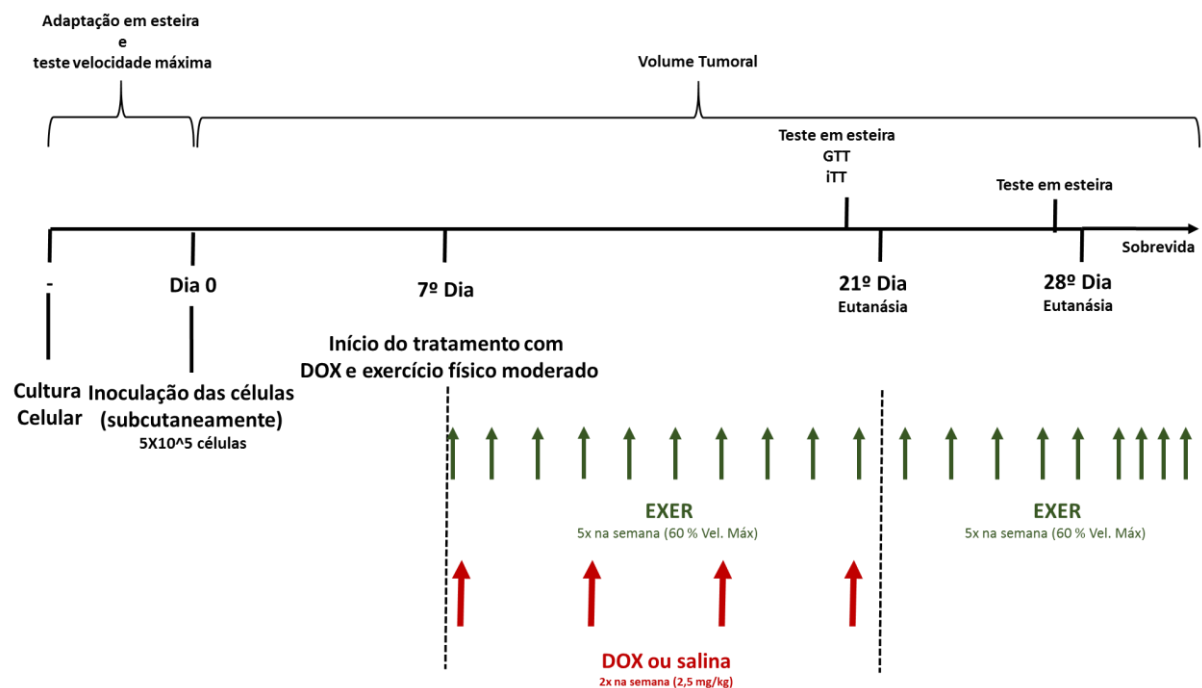


Figura 10. Representação do protocolo experimental 2.

3.2.3 Implante das células de carcinoma de pulmão Lewis (LLC)

As células foram mantidas em meio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM, GIBCO, Invitrogen, NY), suplementados com penicilina (100U/ml), estreptomicina (100 µg/ml) e 10% soro fetal bovino (FBS, Atlanta Biological, Lawrenceville, GA). Foram cultivadas e mantidas em garrafas de cultura à 37°C em uma atmosfera humidificada contendo 5% de CO₂. Foram injetadas subcutaneamente no flanco

direito dos camundongos 5×10^5 células viáveis (diluídas em solução salina à 0,9%). Os animais controle receberam o mesmo volume de solução salina à 0,9%. A viabilidade celular foi avaliada por Trypan Blue.

3.2.4 Cultura de células C2C12

As células C2C12 foram mantidas em meio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM, GIBCO, Invitrogen, NY), suplementados com penicilina (100U/ml), estreptomicina (100 µg/ml) e 10% soro fetal bovino (FBS, Atlanta Biological, Lawrenceville, GA). Foram cultivadas e mantidas em garrafas de cultura à 37°C em uma atmosfera humidificada contendo 5% de CO². Ao atingirem 80% de confluência celular essas células foram submetidas a diferenciação por sete dias em solução DMEM 2% de soro de cavalo (HS, Biowest, Nuaille, FR). Durante o processo de proliferação e diferenciação o meio de cultura foi trocado a cada dois dias. Após a diferenciação as células C2C12 foram submetidas ao tratamento com 100nM de doxorrubicina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, ref. D2975000) ou solução veicular (DMSO) por 48 horas.

3.2.5 Ensaio MTT

A concentração de doxorrubicina utilizada nos ensaios in vitro foram avaliadas por meio do ensaio de viabilidade celular com MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio). Células C2C12 foram plaquadas em placa de 96 wells (2×10^4 células por poço), e diferenciadas após 24 horas. Uma vez diferenciadas, foram submetidas ao tratamento com doxorrubicina em diferentes concentrações (0 – 1000 nmol), solução veículo (DMSO) ou controle negativo (apenas DMEM) por 48 horas. Para determinar a viabilidade celular foram submetidas a 3 horas de incubação à 37°C em meio de cultura DMEM contendo MTT (0.2 mg/ml). Após este período o sobrenadante foi cuidadosamente removido até perfazer um volume final de 25µl. As células foram então homogeneizadas com 100 µl por poço de solução isopropanol/HCl (50 mM). A leitura das placas foi realizada em espectrômetro (absorbância de 595 nm). Os dados do grupo experimental foram relativizados em relação ao grupo que recebeu solução veículo.

3.2.4 Composição corporal, ingestão alimentar e volume do tumor

A ingestão alimentar e o volume do tumor foram monitorados durante todo o tratamento. A determinação do volume tumoral foi realizada utilizando um paquímetro (Western, Ref.1945). Para esta determinação a seguinte equação foi utilizada: $(\text{mm}^3) = abc/2$, onde (a) representa comprimento do tumor, (b) a largura e (c) a altura (KIM; HUAMANI; NIERMANN; LEE *et al.*, 2006). Após eutanásia, os seguintes parâmetros foram mensurados: o peso do músculo sóleo, gastrocnêmio, músculo extensor longo dos dedos (EDL), tumor e peso dos coxins adiposos retroperitoneal, epididimal, mesentérico, subcutâneo e marrom. O índice de adiposidade foi calculado como a soma de todos os depósitos tecidos adiposos brancos.

3.2.5 Protocolo de treinamento

No protocolo experimental 1 e 2, os grupos exercitados foram submetidos ao protocolo de exercício físico aeróbio moderado em esteira que correspondeu à cinco sessões de treino por semana, de uma hora, à 60% da velocidade máxima obtido no teste em esteira (VM_{ax}). No período anterior ao início dos protocolos experimentais, todos os grupos realizaram 5 sessões de exercício físico aeróbio à 10 m/min por 10 minutos como forma de adaptação ao treinamento em esteira.

Para determinar a velocidade máxima em esteira foi realizado um teste incremental, que foi iniciado com 5 min de aquecimento à 10 m/min, e a partir daí aumentada a velocidade em 3m/min a cada minuto até a exaustão dos animais. Esta avaliação foi realizada no período anterior aos protocolos experimentais para a determinação da carga de inicial de trabalho, e durante a última semana, para avaliar alterações no desempenho da corrida em esteira (BATATINHA; LIMA; TEIXEIRA; SOUZA *et al.*, 2017; SILVEIRA; PIMENTEL; SOUZA; BIONDO *et al.*, 2017).

No protocolo 1 os animais exercitados (DOX + EXER) realizaram corrida em esteira por seis semanas, intervalo correspondente a todo período experimental. No protocolo 2, o grupo exercitado (LLC + DOX + EXER) iniciou as sessões de exercício físico aeróbio moderado uma semana após a inoculação do tumor. Foram realizadas duas semanas de treinamento (para os animais que foram eutanasiados no 21º dia) ou três semanas (para os animais que foram eutanasiados no 28º dia).

3.2.6 Histologia do músculo gastrocnêmio

Cortes histológicos da região central músculo gastrocnêmio (10 µm) foram realizados em criostato Leica CM 3050S (Leica Microsystems, Nussloch, Alemanha) à -25°C. Utilizamos o método foi adaptado de Baehr e cols. (2016) para determinar a área de seção transversal da fibra (AST; µm²). Seções do corte histológico do músculo foram identificadas com anti-laminina (1: 1.000; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e visualizadas utilizando o método de detecção com 3,3'-diaminobenzidina (DAB), segundo o manual de instrução. As imagens foram adquiridas utilizando um microscópio Nikon E1000 (Melville, NY, USA) e capturadas por meio de uma câmera digital Nikon DMX1200 (Nikon Corporation, Melville, NY, USA). As imagens digitalizadas foram então analisadas utilizando o software Image-Pro Plus (Media Cybernetics, Silver Spring, MD). Para cada músculo analisado foram avaliados quatro campos, sem sobreposição de regiões, com cerca de 800 fibras analisadas por animal.

3.2.7 Avaliação dos parâmetros séricos

A glicemia, lactato e o colesterol total foram avaliadas no soro através do kit Labtest (Lagoa Santa, MG, Brasil, Ref. 133, 138, 76 e 87 respectivamente). Já a insulina, adiponectina, testosterona, corticosterona e VEGF foram quantificadas pela técnica de imunoenensaio (enzyme-linked immunosorbent assay). O kit de insulina foi obtido da Millipore Corp. (Bedford, MA, EUA, Ref. EZRMI-13K) e os kits de adiponectina e VEGF foram obtidos da R&DSystems (Minneapolis, MN, EUA, Ref. DY1119 e DY493 respectivamente). Os kits de corticosterona e testosterona foram obtidos da Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, EUA. Ref. 500655 e 582701, respectivamente). Todos os ensaios colorimétricos foram lidos em espectrofotômetro EON (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) respeitando a densidade ótica ideal estabelecida no manual de fabricação de cada um dos kits.

3.2.8 Determinação da concentração de TNF- α , IL-10, IL-6, IL1ra, IL-1 β , MCP-1 e VEGF

O músculo gastrocnêmio e o tumor foram homogeneizados em tampão RIPA (0,625% de Nonidet P-40, 0,625% de deoxicolato de sódio, fosfato de sódio 6,25mM, e 1mM de ácido tetra-acético de etilenodiamina à pH 7,4) contendo 10 ug/ml do coquetel com inibidor de protease (Roche, Mannheim, Alemanha, Ref. 04693116001). Os homogenatos foram centrifugados a 14000g durante 45 min à 4°C e coletado o sobrenadante. Avaliamos a concentração de proteína através do ensaio de Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). A avaliação quantitativa de IL-6, MCP-1, IL-10, IL-1 β , IL1-ra, TNF- α e VEGF foi avaliada por ELISA (DuoSet ELISA, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA Ref. DY406, DY479, DY417, DY401, DY480, DY410 e DY493 respectivamente).

3.2.9 Teste de tolerância à insulina

Os camundongos permaneceram em restrição alimentar por 6 horas e tiveram a glicemia capilar caudal (Accu-Chek Active, Roche, Mannheim, Alemanha) avaliada a cada 5 minutos após administração intraperitoneal de insulina (0,5 UI/kg de peso corporal) durante um intervalo de 30 minutos. n =(14-13). A constante de decaimento da glicose foi mensurada como descrito por Bonora e *cols.* (BONORA; MANICARDI; ZAVARONI; COSCELLI *et al.*, 1987).

3.2.10 Teste de tolerância à glicose

Após restrição alimentar prévia de 6 horas os animais receberam uma dose intraperitoneal de glicose (2 g/kg peso corporal). A determinação da glicemia capilar caudal foi realizada utilizando um glicosímetro (Accu-Chek Active, Roche, Mannheim, Alemanha) e avaliado nos seguintes pontos após a administração da glicose: 0, 5, 15, 30, 60 e 90 minutos. n = (5).

3.2.11 Determinação da expressão gênica

No músculo gastrocnêmio foi avaliada a expressão genica de MuRF1, Atrogin-1, FoxO1, FoxO3, Mstn e Il6. No tumor foi avaliado a expressão gênica de Il6, Abcb1a, Abcg2, Abcc2, Flt-1, Flk-1 e Flt-4. Em células C2C12 foi avaliado a expressão de MuRF1, Atrogin-1, Fbxo21, Fbxo30, FoxO1, FoxO3, Capn1, Capn2, Map1lc3a, Map1lc3b e Uik1. As amostras foram homogenizados em reagente TRIzol (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA, ref. 15596026) para extração do RNA total seguindo as recomendações do fabricante (CHOMCZYNSKI; SACCHI, 1987). O RNA foi quantificado por leitura em espectrofotômetro a 260 nm ($A_{260\text{ nm}} = 1$ corresponde a 44 $\mu\text{g/mL}$) e o grau de pureza determinado pelo razão 260/280 nm (no qual razão igual a 2 indica alto grau de pureza). O cDNA foi sintetizado a partir de 2 μg do RNA total extraído utilizando a transcriptase reversa (High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Thermo Fisher, Carlsbad, CA, USA, Ref. 4368814). A expressão gênica foi quantificada por PCR em tempo real (HIGUCHI; DOLLINGER; WALSH; GRIFFITH, 1992), utilizando o aparelho StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, CA, USA) e SYBER Green (Fast SYBR™ Green PCR Master Mix, Applied Biosystems, CA, USA, ref. 4385612) como marcador fluorescente. A quantificação da expressão dos genes foi realizada usando o método da Ct comparativa (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Foi utilizado como controle interno a expressão de Rpl-19 (para o gastrocnêmio), Actb, Gapdh e Hprt (para o carcinoma de pulmão Lewis). A sequência de primer's utilizadas são descritas na Tabela 1.

Tabela 1. Sequências dos *primer's* do RT-PCR

| Gene | Left Primer | Right Primer | GenBank |
|----------|------------------------------|--------------------------------|----------------|
| MuRF1 | 5' GTGTGAGGTGCCTACTTGCTC 3' | 5' GCTCAGTCTTCTGTCCTTGGGA 3' | NM_001039048.2 |
| Atrogin1 | 5' ACAAAGGAAGTACGAAGGAGCG 3' | 5' GGCAGTCGAGAAGTCCAGTC 3' | NM_026346.3 |
| Fbxo21 | 5' GGGCAGGTGAGTCCTCTATG 3' | 5' GAGCAGAGACATGCTGATGG 3' | NM_145564.4 |
| Fbxo30 | 5' CTCAGTCTCGTGAATGGTAA 3' | 5' TGCTCAGGATGTCAGCAAA 3' | NM_027968.3 |
| Foxo1 | 5' CCCAGGCCGGAGTTTAACC 3' | 5' GTTGCTCATAAAGTCGGTGCT 3' | NM_019739.3 |
| Foxo3 | 5' CTGGGGGAACCTGTCCTATG 3' | 5' TCATTCTGAACGCGCATGAAG 3' | NM_019740.2 |
| Capn1 | 5' CCAACCTCCCTGATGAGAA 3' | 5' TGTAGCTCCTTGACGCTGA 3' | NM_007600.3 |
| Capn2 | 5' CTTGCTTCGTGGCTGAGTT 3' | 5' CCGTAAGTTCAAGGTCCAG 3' | NM_009794.4 |
| Map1lc3a | 5' GCGCTACAAGGGTGAGAAG 3' | 5' TTGACCAGCAGGAAGAAGG 3' | NM_025735.3 |
| Map1lc3b | 5' CAAGTTCCTGGTGCCTGAC 3' | 5' GCCGTCTTCATCTCTCTCACT 3' | NM_026160.5 |
| Ulk1 | 5' GCAGCACAGACAGCCTACA 3' | 5' TGGAAGAGCCCCTGAGAA 3' | NM_001347394.1 |
| Rpl19 | 5' CAATGCCAACTCCCGTCA 3' | 5' GTGTTTTTCCGGCAAACGAG 3' | NM_009078.2 |
| Il6 | 5' GTTGTGCAATGGCAATTCTG 3' | 5' CCAGTTTGGTAGCATCCATC 3' | NM_001314054.1 |
| Abcb1a | 5' CAGCAGTCAGTGTGCTTACAA 3' | 5' ATGGCTCTTTTATCGGCCTCA 3' | NM_011076.3 |
| Abcg2 | 5' GAACTCCAGAGCCGTTAGGAC 3' | 5' CAGAATAGCATTAAAGGCCAGGTT 3' | NM_011920.3 |
| Abcc2 | 5' GTGTGGATTCCCTTGGGCTTT 3' | 5' CACAACGAACACCTGCTTGG 3' | NM_013806.2 |
| Flt1 | 5' ACGTTAGCACATTGGTGGT 3' | 5' AAGCCATTTCGGCACATCT 3' | NM_010228.4 |
| Flk1 | 5' GCAGCAGGATGGCAAAGA 3' | 5' TAGGCAGGGAGAGTCCAGAA 3' | NM_010612.3 |
| Flt4 | 5' CTGGCAAATGGTTACTCCATGA 3' | 5' ACAACCCGTGTGTCTTCACTG 3' | NM_008029.3 |
| Hprt | 5' GGCTTACCTCACTGCTTTCC 3' | 5' AATCACGACGCTGGGACT 3' | NM_013556.2 |
| Actb | 5' CCTTCCTTCTTGGGTATGGA 3' | 5' GAGGTCTTTACGGATGTCAACG 3' | NM_007393.5 |
| Gapdh | 5' CAAGCTCATTTCTGGTATGACA 3' | 5' GCCTCTCTTGCTCAGTGTCC 3' | NM_001289726.1 |

3.2.12 Avaliação da síntese proteica *in vivo* (SUnSET)

A síntese proteica foi avaliada utilizando o método Surface SEnsing of Translation (SUnSET), conforme descrito em Baehr *et al.* (2016). A puromicina é um antibiótico produzido pela bactéria *streptomyces alboniger* e que tem uma estrutura análoga a do aminoacil-RNA de tirosil. Por esta característica, é incorporada nas cadeias peptídicas nascentes, de forma que quando utilizada em baixas concentrações a assimilação desta molécula é tida como um marcador da síntese proteica. Após dissolução em solução salina estéril, os animais receberam uma injeção intraperitoneal de puromicina (EMD Millipore, Billerica, MA, EUA; ref. 540222) na concentração de 0,02 $\mu\text{mol/g}$ de peso corporal. Trinta minutos após esta administração, o músculo gastrocnêmio foi rapidamente coletado e armazenado a -80°C . O músculo esquelético foi pulverizado e homogeneizado em tampão de lise de sacarose (Tris 50 mM pH 7,5, sacarose 250 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, Triton X 100 a 1%, NaF 50 mM). Após isto a amostra foi centrifugada a 14000 g por 4 min e as

concentrações de proteínas determinadas pelo método de Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). A concentração de proteínas associadas à puromicina foi avaliada utilizando um anticorpo primário para puromicina (EMD Millipore).

3.2.13 Immunoblotting

O músculo gastrocnêmio e o tumor foram homogeneizados em tampão de extração contendo inibidores de protease (Roche Diagnostics GmbH, Sandhoferstrasse, Mannheim, Alemanha, ref. 11697498001) e fosfatase (Roche Diagnostics GmbH, Sandhoferstrasse, Mannheim, Germany ref. 4906845001). Após a centrifugação, o sobrenadante foi submetido a quantificação proteica determinadas pelo ensaio de Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA), utilizando uma curva padrão de albumina.

A determinação da expressão proteica foi adaptada conforme descrito por Towbin e *co/s.* (1979). Foram utilizadas amostras diluídas em tampão de Laemmli na concentração de proteína em 50 µg. As amostras foram então submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida SDS (SDS-PAGE) (SHAPIRO; VINUELA; MAIZEL, 1967), transferidas para membrana de PVDF e incubadas com anticorpos primários contra AMPK α^{Thr172} (ref. 2531), AMPK α (ref. 2532), Beclin (ref. 3495), LC3 A/B (ref. 12741), ATG7 (ref. 8558), ATG3 (ref. 3415), ATG5 (ref. 12994) e pNFkB^{p65} (ref. 3033s), p53 (ref. 32532), Acetil p53^(Lys379) (ref. 2570) (obtidos da Cell Signaling Technology® Danvers, MA, USA), Puromicina (EMD Millipore, Billerica, MA, EUA, ref 540222), GAPDH (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA, ref. SC 25778), α -actinina (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA, ref. SC 130619), e depois incubados com um anticorpo anti-IgG conjugado com peroxidase. Após as incubações, estas membranas foram incubadas com o substrato de peroxidase (ECL Clarity TM, Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). No primeiro protocolo experimental o Ponceau S staining foi utilizado como controle de carregamento das amostras (GILDA; GOMES, 2013). No segundo protocolo foi utilizado como controle interno expressão de GAPDH (músculo esquelético) e α -actinina (tumor). As imagens foram obtidas utilizando o equipamento Amersham™ Imager 600 (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) e quantificadas por densitometria óptica utilizando o software Image J (NIH, Maryland, USA).

3.3 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism versão 6.0 para Windows (GraphPad Software, SanDiego, CA, USA). Os dados foram expressos como média e erro padrão. Para a comparação entre dois grupos no ensaio com células C2C12 foi utilizado o Teste-t de Student. Para determinar a viabilidade celular foi utilizado o teste ANOVA one-way seguido do pós-teste de Bonferroni. Nos experimentos in vivo a comparação estatística entre os grupos foi feita por meio do teste ANOVA one-way ou ANOVA two-way, quando apropriado, seguido do pós-teste de Bonferroni. A sobrevida foi avaliada utilizando a curva de Kaplan-Meier e comparada utilizando o teste de log-rank (Mantel-Cox). O nível de significância adotado foi $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Protocolo experimental 1 – Efeito da metformina e do exercício físico aeróbio sobre a perda muscular induzida por doxorubicina

Todos os grupos tratados com doxorubicina reduziram o peso corporal, de modo que ambos tratamentos foram incapazes de restaurar este prejuízo (Figura 11 A). Esta mudança se iniciou a partir da quarta semana de tratamento. Ademais, a perda de peso corporal pelo tratamento com doxorubicina foi promovida sem qualquer alteração no consumo alimentar (Figura 11 B).

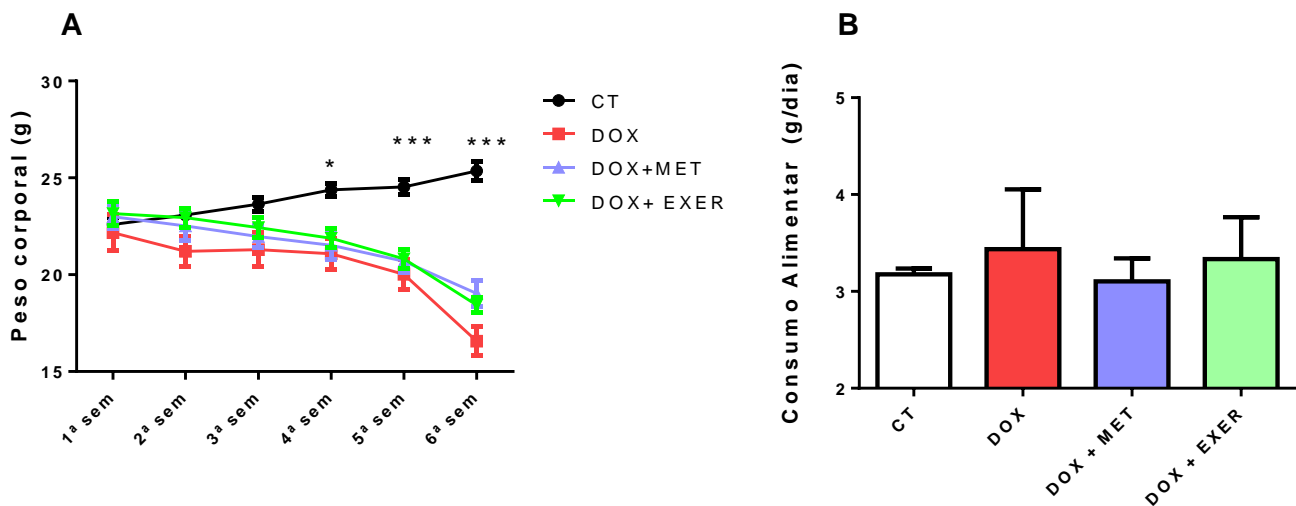


Figura 11. O tratamento com doxorubicina diminui o peso corporal. A. Peso corporal durante o tratamento (g). $n=8-10$; B. Ingestão de alimentos durante o tratamento (g/dia). $n=7-4$. Os valores representam a média e o erro padrão dos dados obtidos a partir da análise. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs. todos os outros grupos. CT, controle; DOX, doxorubicina; MET, metformina; EXER, exercício físico aeróbio moderado.

A redução do peso corporal promovida pelo tratamento com doxorubicina (DOX) ocorreu às custas da diminuição da massa magra e adiposa, sendo que o tratamento farmacológico com metformina e exercício físico (DOX+MET e DOX+EXER) não mostraram efeitos protetivos nesse contexto. Houve redução em todos os grupos tratados com doxorubicina no peso do músculo gastrocnêmio e sóleo, além dos coxins adiposos subcutâneo, epididimal, retroperitoneal e mesentérico (CT vs. DOX, CT vs. DOX+MET e CT vs. DOX+EXER, $p < 0.05$) (Tabela 2). O peso do tecido adiposo marrom não foi modificado (Tabela 2, $p > 0.05$).

Para determinar uma concentração não letal de doxorrubicina nos ensaios in vitro (C2C12) avaliamos a viabilidade celular por MTT. A concentração de 100 nM foi considerada não letal ($p > 0.05$), enquanto concentrações maiores de doxorrubicina (200 nM, 500 nM e 1000 nM) reduziram a viabilidade celular (DMSO vs. DOX, $p < 0.001$) (Figura 12 A). A exposição de miotubos C2C12 à doxorrubicina (100nM) por 48 horas aumentou a expressão de Atrogin1, Fbxo21, FoxO1, FoxO3 e Ulk1 (DMSO vs. DOX, $p < 0.05$) (Figura 12 B). Não houve alteração na expressão de MuRF1, Fbxo30, Map1lc3a, Map1lc3a, Capn1 e Capn2 (DMSO vs. DOX, $p > 0.05$).

Tabela 2. A doxorrubicina causa severa perda de tecido adiposo e de músculo esquelético

| | CT | DOX | DOX + MET | DOX + EXER |
|----------------------------|--------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Gastrocnêmio | 303.4±13.71 | 209.7±16.32 *** | 202.80±11.42*** | 207.50±10.22*** |
| Sóleo | 16.80±0.99 | 11.00±0.66 *** | 11.10±0.73 *** | 11.78±0.49 *** |
| T. adiposo subcutâneo | 207.1±13.32 | 89.25±15.53 * | 65.92±12.06 * | 89.17±10.04* |
| T. adiposo epididimal | 306.1±39.55 | 48.00±12.18 * | 86±44.85 * | 37.86±7.44 * |
| T. adiposo retroperitoneal | 78.15±8.55 | 8.83±3.49 * | 3.41±1.13 * | 3.66±1.71 * |
| T. adiposo mesentérico | 426.70±24.96 | 234.60±53.83 * | 209.40±21.39 * | 235.30±22.91 * |
| T. adiposo marrom | 92.29±13.99 | 81.13±8.20 | 57.00±14.19 | 68.43±12.70 |

Valores expressos em mg. Os valores representam a média e o erro padrão dos dados obtidos a partir da análise de 8-10 animais por grupo. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ vs. grupo CT. T, tecido; CT, controle; DOX, doxorrubicina; MET, metformina; EXER, exercício físico aeróbio moderado.

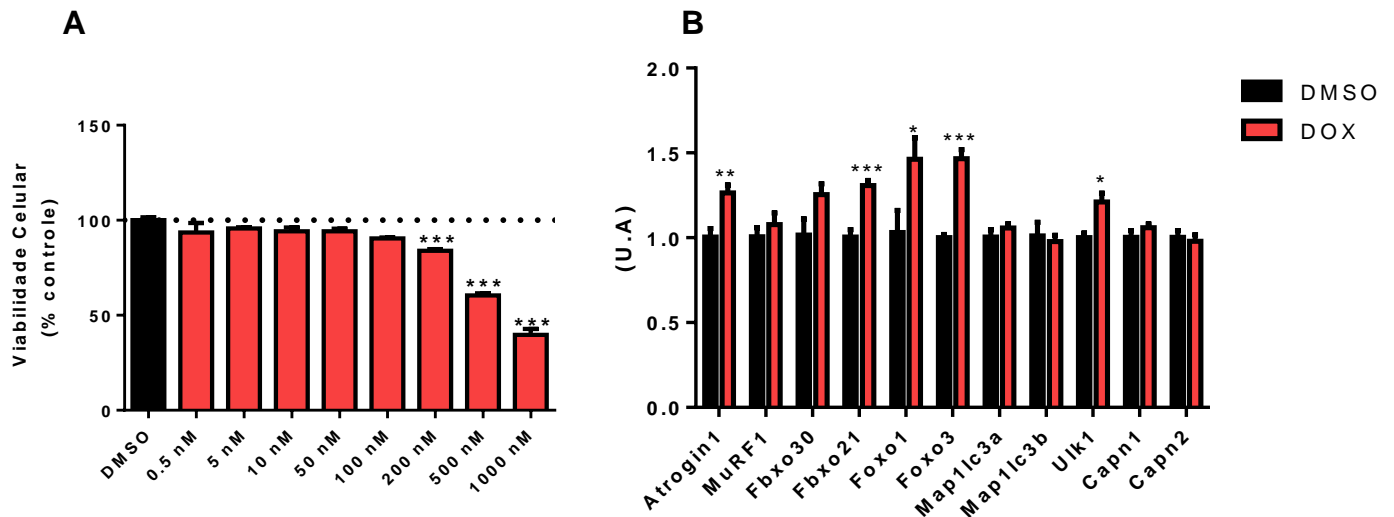


Figura 12. Efeito da doxorrubicina na expressão de proteínas ligadas ao desenvolvimento da proteólise. A. Viabilidade celular de miotubos submetidas ao tratamento com diferentes concentrações de doxorrubicina (0 - 1000nM) por 48 horas. B. Expressão gênica de FoxO, E3 ligases, subunidades catalíticas de calpáinas e proteínas envolvidas no processo de autofagia. Valores representam a média e o erro padrão da análise dos dados obtidos. n=5-6. DMSO, solução veículo - Dimetilsulfóxido; DOX, doxorrubicina. * $p < 0.05$ vs. DMSO, ** $p < 0.01$ vs. DMSO; *** $p < 0.001$ vs. DMSO.

Com base nas reduções do peso do tecido adiposo causado pela doxorubicina, avaliamos a concentração de adiponectina circulante. Esta adipocina, no entanto não sofreu alteração em sua concentração (Tabela 3). Tanto o tecido adiposo quanto o músculo esquelético desempenham um papel fundamental na absorção de glicose mediada por insulina. Baseado na alteração da homeostase destes tecidos resultado do tratamento quimioterápico, avaliamos os indicadores de glicemia e insulinemia. O tratamento com doxorubicina diminuiu a glicemia basal (CT vs. DOX, $p < 0.01$), sem alteração na concentração de insulina (Tabela 3, $p > 0.05$). Os tratamentos associados à quimioterapia não reverteram este efeito sobre a glicemia (CT vs. DOX+MET, $p < 0.001$ e CT vs. DOX+EXER, $p < 0.01$) (Tabela 3).

Tabela 3. Efeito da doxorubicina e associações sobre parâmetros séricos

| | CT | DOX | DOX+MET | DOX+EXER |
|-----------------------------|------------|--------------|----------------|--------------|
| Glicose (mg/dl) | 129.2±4.13 | 100.2±6.14** | 97.54±5.81 *** | 102.3±5.34** |
| Insulina (ng/ml) | 0.63±0.06 | 0.34±0.07 | 0.51±0.06 | 0.60±0.08 |
| Adiponectina sérica (ng/ml) | 1493±442,4 | 2193±683,9 | 1330±358,3 | 1226±253,9 |

Os valores representam a média e o erro padrão dos dados obtidos a partir da análise. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ vs. grupo CT. CT, controle; DOX, doxorubicina; MET, metformina; EXER, exercício físico aeróbio moderado.

A relação entre hormônios anabólicos e catabólicos é sem dúvida um importante fator de controle do balanço proteico. Investigamos, portanto, se os tratamentos poderiam causar alterações na concentração circulante de testosterona e corticosterona. A concentração de corticosterona aumentou no grupo recebeu doxorubicina de maneira isolada e a combinação à metformina ou exercício físico foram capazes de reduzi-la (CT vs. DOX+MET, $p < 0.001$; DOX vs. DOX+MET, $p < 0.01$ e DOX vs. DOX+EXER, $p < 0.01$) (Figura 13 A). Não houve alteração na concentração de testosterona (Figura 13 B).

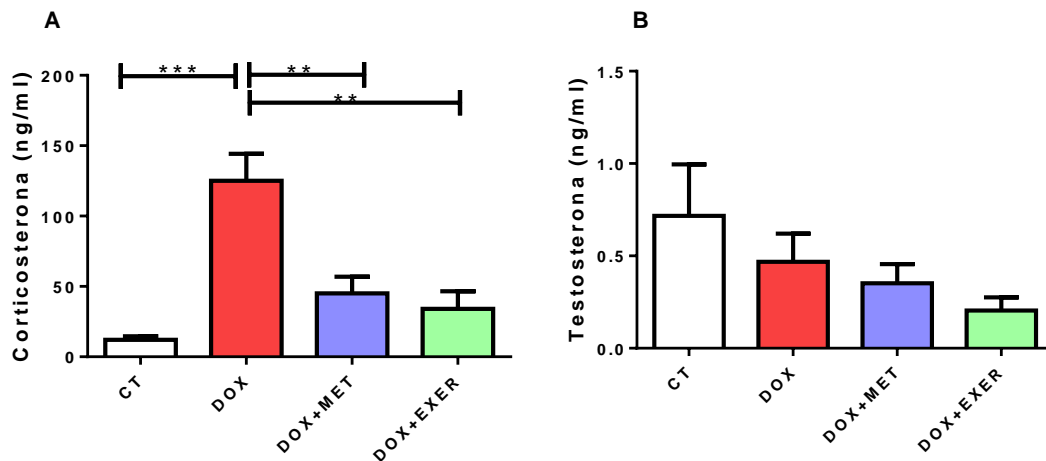


Figura 13. Exercício físico aeróbico e metformina reduzem o efeito da doxorrubicina sobre a corticosterona circulante. A. Corticosterona sérica. $n = 4-5$; B. Testosterona sérica. $n = 9-10$. Os valores representam a média e o erro padrão dos dados obtidos a partir da análise. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. CT, controle; DOX, doxorrubicina; MET, metformina; EXER, exercício físico aeróbico moderado.

A velocidade máxima obtida em teste de esteira após 6 semanas de treinamento aeróbico aumentou no grupo exercitado em comparação a todos os grupos (CT vs. DOX+EXER, $p < 0.05$; DOX vs. DOX+EXER, $p < 0.001$ e DOX+MET vs. DOX+EXER, $p < 0.001$) (Figura 14). Camundongos que receberam apenas o tratamento com doxorrubicina, por outro lado, reduziram o desempenho físico em relação ao grupo controle (CT vs. DOX, $p < 0.05$) (Figura 14). O desempenho no teste em esteira rolante não foi alterado pela administração de metformina combinada ao tratamento com doxorrubicina (CT vs. DOX+MET, $p > 0.05$) (Figura 14).

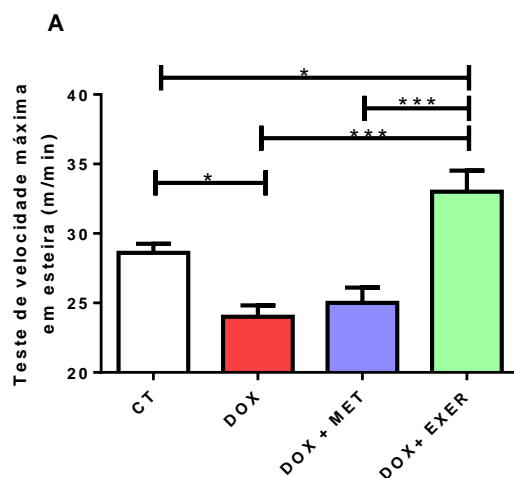


Figura 14. O exercício aeróbico impede a redução da velocidade máxima no teste em esteira causada pela doxorrubicina. A. Velocidade máxima final no teste em esteira (m / min). Os valores representam a média e o erro padrão dos dados obtidos a partir da análise. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$. CT, controle; DOX, doxorrubicina; MET, metformina; EXER, exercício físico aeróbico moderado.

Conforme demonstrado pela Figura 15, a quimioterapia por si só causou redução na área de secção transversa da fibra muscular (CT vs. DOX, $p < 0.001$). Este efeito não foi impedido pela combinação à metformina ou ao exercício físico (CT vs. DOX+MET, $p < 0.001$ e CT vs. DOX+EXER, $p < 0.01$) (Figura 15 A/C).

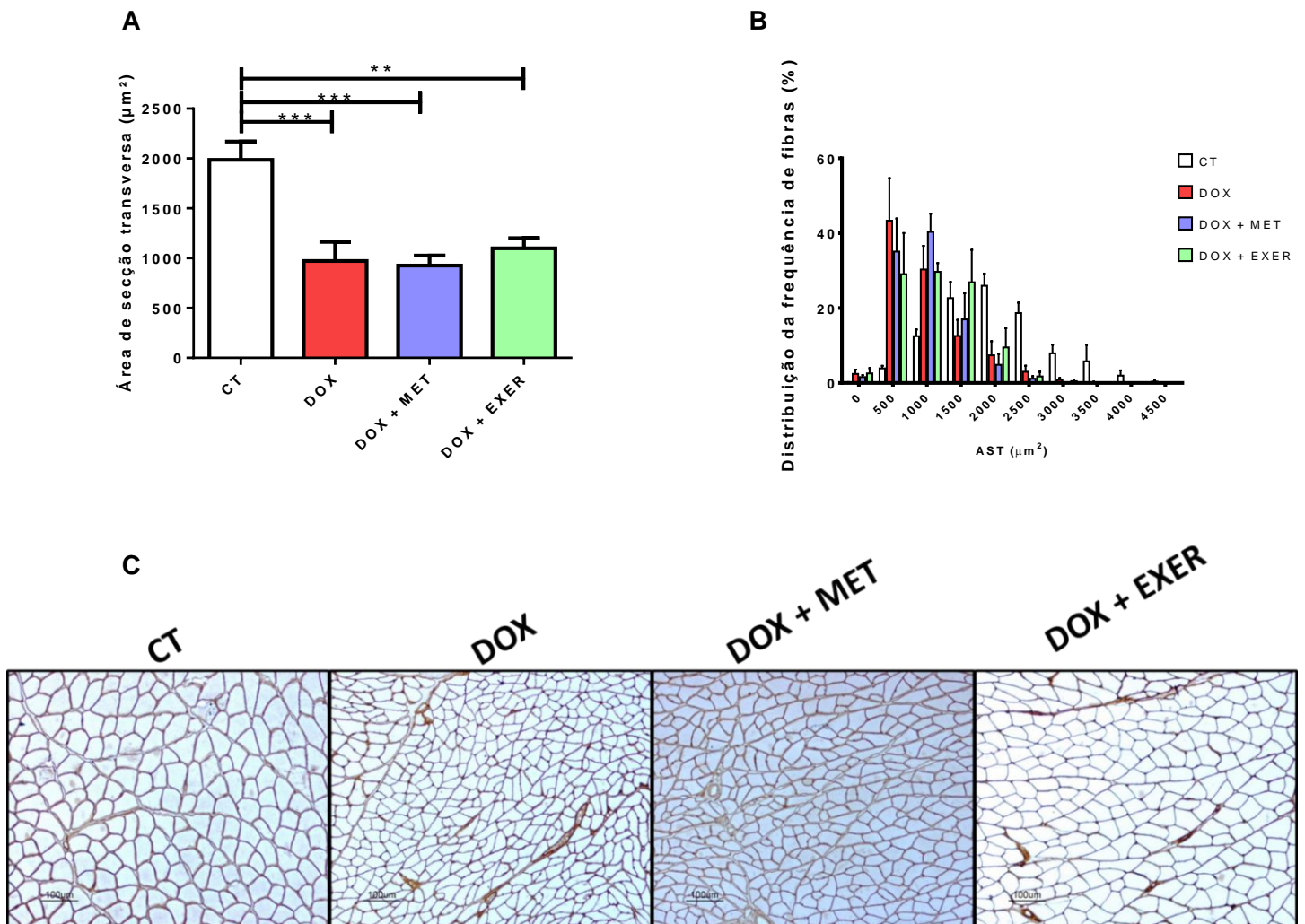


Figura 15. Efeito da doxorubicina e associações na área de secção transversa do músculo gastrocnêmio. A. Área de secção transversa do músculo esquelético (μm^2); B. Distribuição da frequência da área de fibra; C. Imagens histológicas representativas (escala $100\mu\text{m}$). Os valores representam a média e o erro padrão dos dados obtidos a partir da análise. $n=5-6$. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. AST, área de secção transversa; CT, controle; DOX, doxorubicina; MET, metformina; EXER, exercício físico aeróbio moderado.

O exercício físico aeróbio e a metformina são capazes de influenciar o metabolismo muscular, sendo este efeito, em parte, atribuído à modulação da atividade de AMPk. Nossos dados demonstram que na comparação ao grupo tratado apenas com doxorubicina (DOX) houve aumento da expressão da razão de

pAMPK α /AMPk α total no grupo exercitado, havendo tendência de incremento no grupo que fez coadministração com metformina (DOX vs. DOX+MET, $p=0.069$ e DOX vs. DOX+EXER, $p < 0.05$) (Figura 16).

A

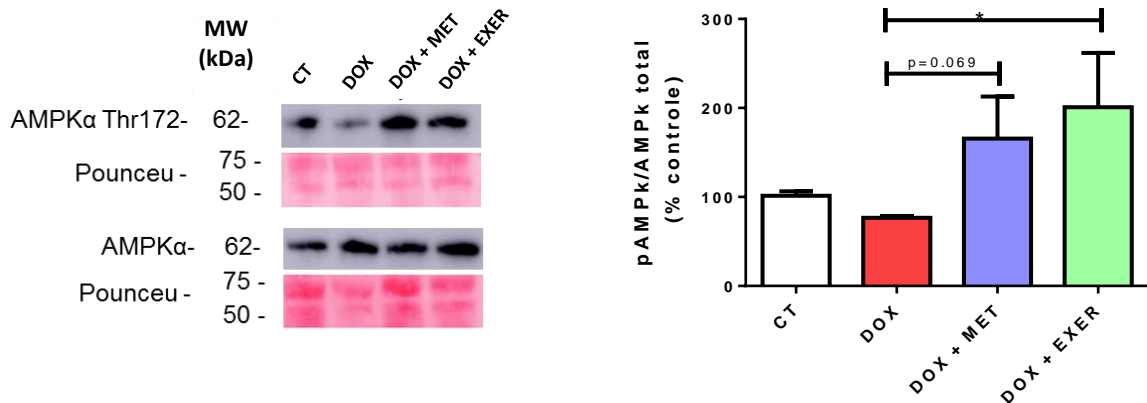


Figura 16. Efeito na expressão de AMPK no músculo gastrocnêmio. A. Imagem representativa da análise de western blot da expressão de AMPK α e AMPK α Thr172 no músculo gastrocnêmio e sua quantificação. Os valores representam a média e o erro padrão dos dados obtidos a partir da análise. $n=4-6$. * $p < 0.05$. CT, controle; DOX, doxorubicina; MET, metformina; EXER, exercício físico aeróbio moderado.

Suportado pelos resultados que demonstraram redução na massa muscular no tratamento com doxorubicina, avaliamos a síntese proteica. A síntese proteica total avaliada pela incorporação da puromicina foi reduzida pelo tratamento com doxorubicina (CT vs. DOX, $p < 0.05$) (Figura 17 A). Por outro lado, o exercício aeróbio resgatou parcialmente este efeito, na medida que isto não foi observado pela combinação à metformina (CT vs. DOX+MET, $p < 0.05$ e CT vs. DOX+EXER, $p > 0.05$) (Figura 17 A).

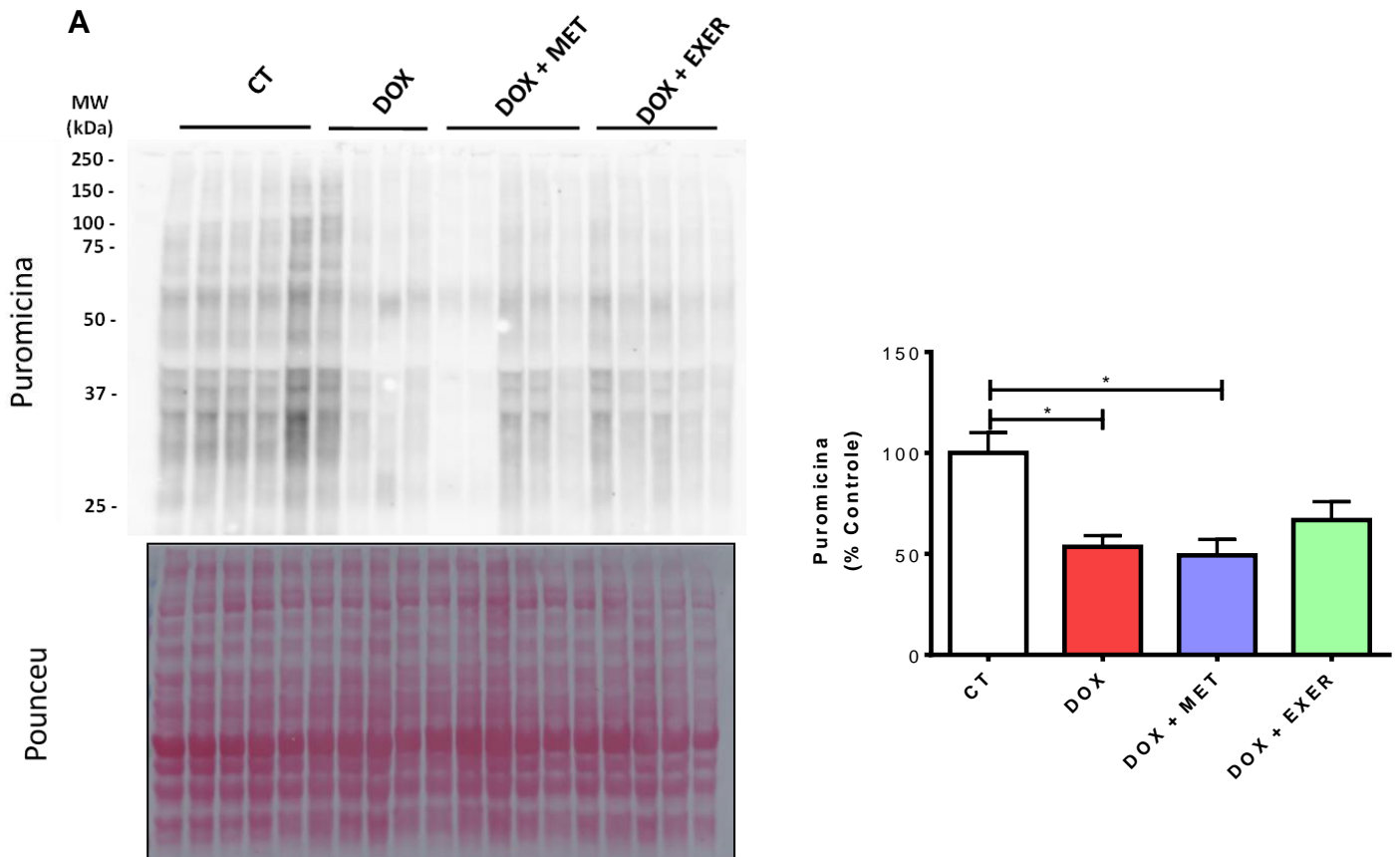


Figura 17. Efeitos dos tratamentos sobre a síntese proteica no músculo gastrocnêmio. A. Síntese proteica no músculo gastrocnêmio determinado pelo método SUnSET. Os valores representam a média e o erro padrão dos dados obtidos a partir da análise. $n=4-5$. * $p < 0.05$. CT, controle; DOX, doxorubicina; MET, metformina; EXER, exercício físico aeróbico moderado.

Quando comparado ao grupo controle, o tratamento isolado com doxorubicina não alterou a expressão de proteínas ligadas à sinalização da autofagia no músculo gastrocnêmio (CT vs. DOX $p > 0.05$), muito embora os tratamentos combinados (DOX+MET e DOX+EXER) tenham reduzido a expressão destas em relação ao tratamento quimioterápico isolado (DOX) (Figura 18). Houve redução na expressão de Atg7 tanto pela associação ao exercício físico quanto pela metformina na comparação com o grupo DOX (DOX vs. DOX+MET, $p < 0.05$; DOX vs. DOX+EXER, $p < 0.05$) (Figura 18 A). Os animais exercitados ainda reduziram a expressão de LC3 A/B em relação ao grupo que recebeu apenas doxorubicina (DOX vs. DOX+EXER, $p < 0.05$) (Figura 18 B).

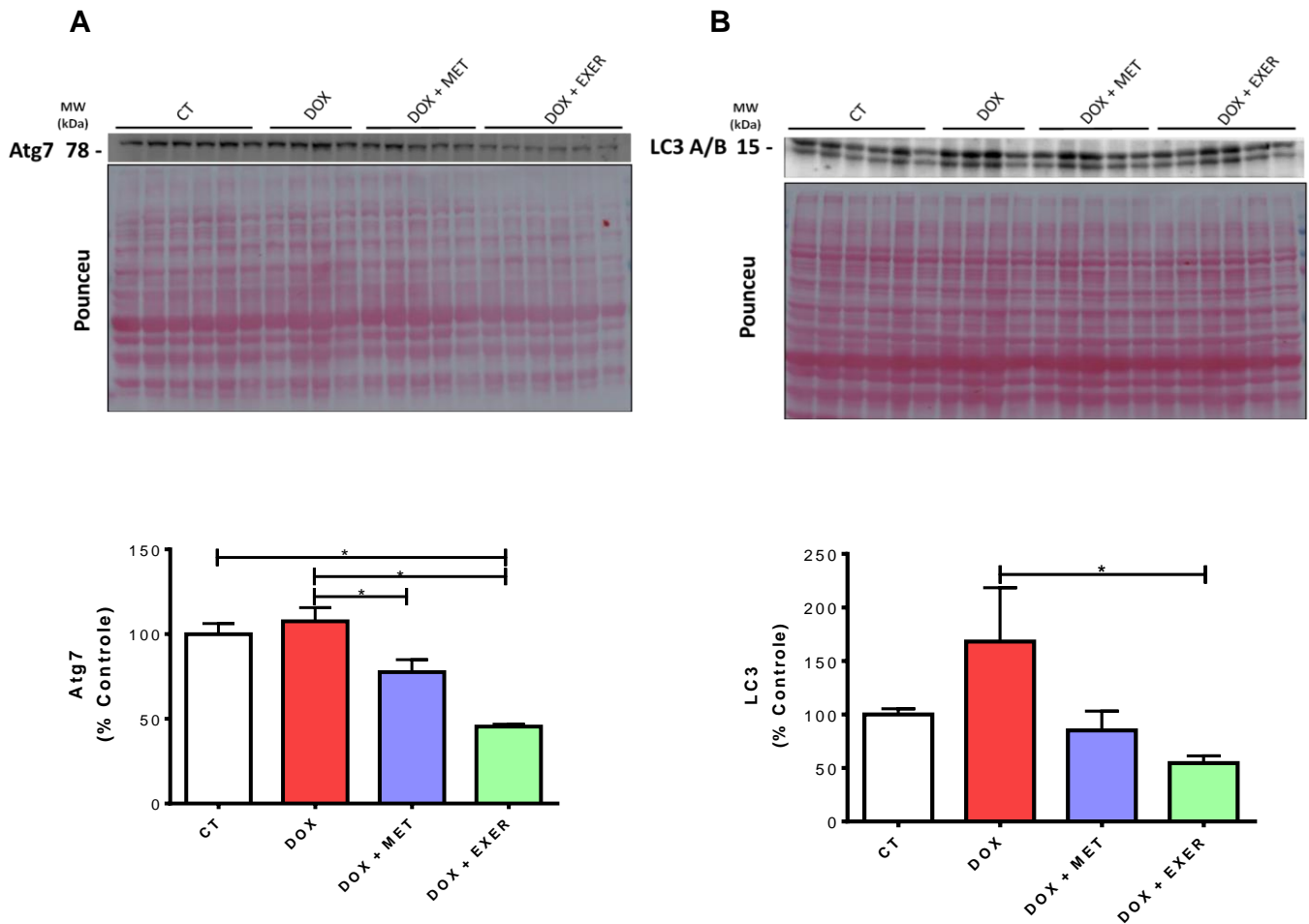


Figura 18. Efeito do exercício físico e metformina durante o tratamento quimioterápico na expressão de proteínas envolvidas na autofagia. A. Expressão da proteína Atg7 no músculo gastrocnêmio; B. Expressão proteica de LC3 β no músculo gastrocnêmio. Os valores representam a média e o erro padrão dos dados obtidos a partir da análise. $n=4-6$. $*p < 0.05$. CT, controle; DOX, doxorubicina; MET, metformina; EXER, exercício físico aeróbio moderado.

4.2 Protocolo experimental 2 – Efeito da continuidade do exercício físico aeróbio após a quimioterapia em um modelo experimental de câncer

Em comparação a animais que não foram submetidos a nenhum tipo de tratamento, houve redução na sobrevivência de camundongos com carcinoma de pulmão de Lewis tratados com doxorrubicina (LLC vs. LLC+DOX, $p < 0.001$) (Figura 19 A). A média de sobrevivência de animais portadores de tumor (LLC) foi de 36 dias, tendo a administração de doxorrubicina (LLC+DOX) reduzido este intervalo em 8 dias ($p < 0.001$). No entanto, quando a quimioterapia foi associada ao exercício físico este efeito deletério da quimioterapia foi mitigado (LLC+DOX vs. LLC+DOX+EXER, $p < 0.001$) (Figura 19 A), de modo que restabeleceu a sobrevivência do grupo que combinou quimioterapia e exercício físico a valores semelhantes ao do grupo com tumor (LLC vs. LLC+DOX+EXER, $p > 0.05$) (Figura 19 A). Interessante notar que, na ausência do tumor, camundongos submetidos a semelhante protocolo de administração de doxorrubicina não houve mortalidade (CT vs. DOX, $p > 0.05$) (Figura 19 B).

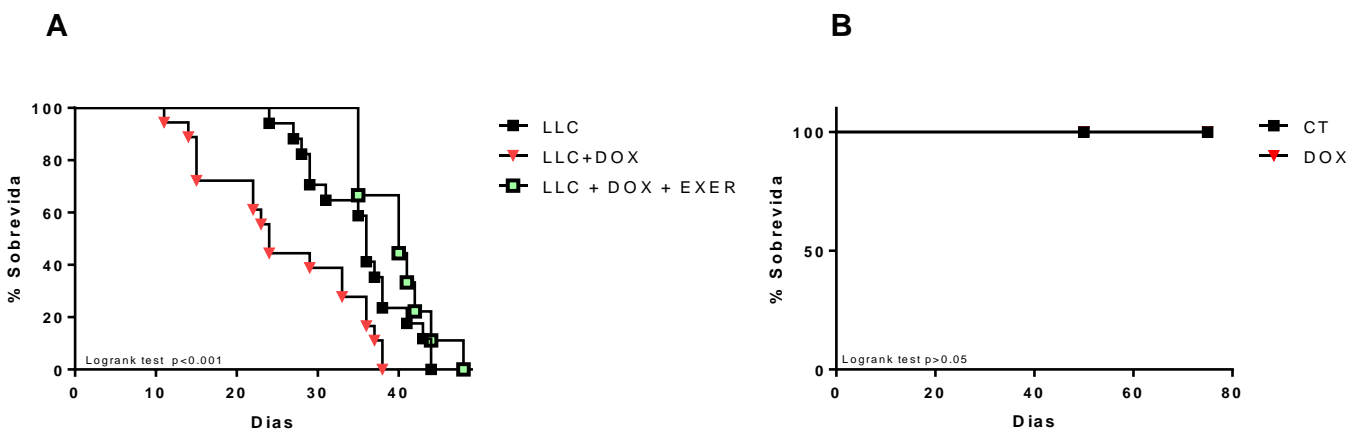


Figura 19. Efeito da combinação do exercício físico moderado ao tratamento com doxorrubicina na sobrevivência de camundongos. A. Efeito da doxorrubicina e da combinação de doxorrubicina e exercício físico na curva de sobrevivência de camundongos com carcinoma de pulmão Lewis. $n=18-9$. B. Curva de sobrevivência de camundongos C57BL/6 submetidos ao tratamento quimioterápico na ausência do carcinoma de pulmão Lewis. $n=13-6$. O valor de p foi determinado pelo teste log-rank for trend. LLC, Lewis Lung Carcinoma; DOX, doxorrubicina; EXER, exercício físico aeróbio moderado.

O tratamento com o doxorrubicina causou redução do peso corporal. Contudo, a continuidade do exercício físico, particularmente no período pós-quimioterápico atenuou este efeito (Figura 20 A). No 21º dia todos os grupos tratados com

doxorrubicina apresentaram redução do peso corporal (LLC vs. LLC+DOX e LLC vs. LLC+DOX+EXER, $p < 0.01$) (Figura 20 A). Camundongos sedentários e tratados com doxorrubicina, mesmo mediante à interrupção da quimioterapia não recuperaram esta perda de peso, que foi estendida até o 28º dia (LLC vs. LLC+DOX, $p < 0.001$). Em contrapartida a continuidade do exercício físico após a interrupção da administração de doxorrubicina minimizou este efeito (LLC vs. LLC+DOX+EXER, $p > 0.05$ - 28º dia) (Figura 20 A). Não houve alteração do consumo alimentar durante ou sequencialmente à quimioterapia (3º e 4º semana respectivamente) (Figura 20 C).

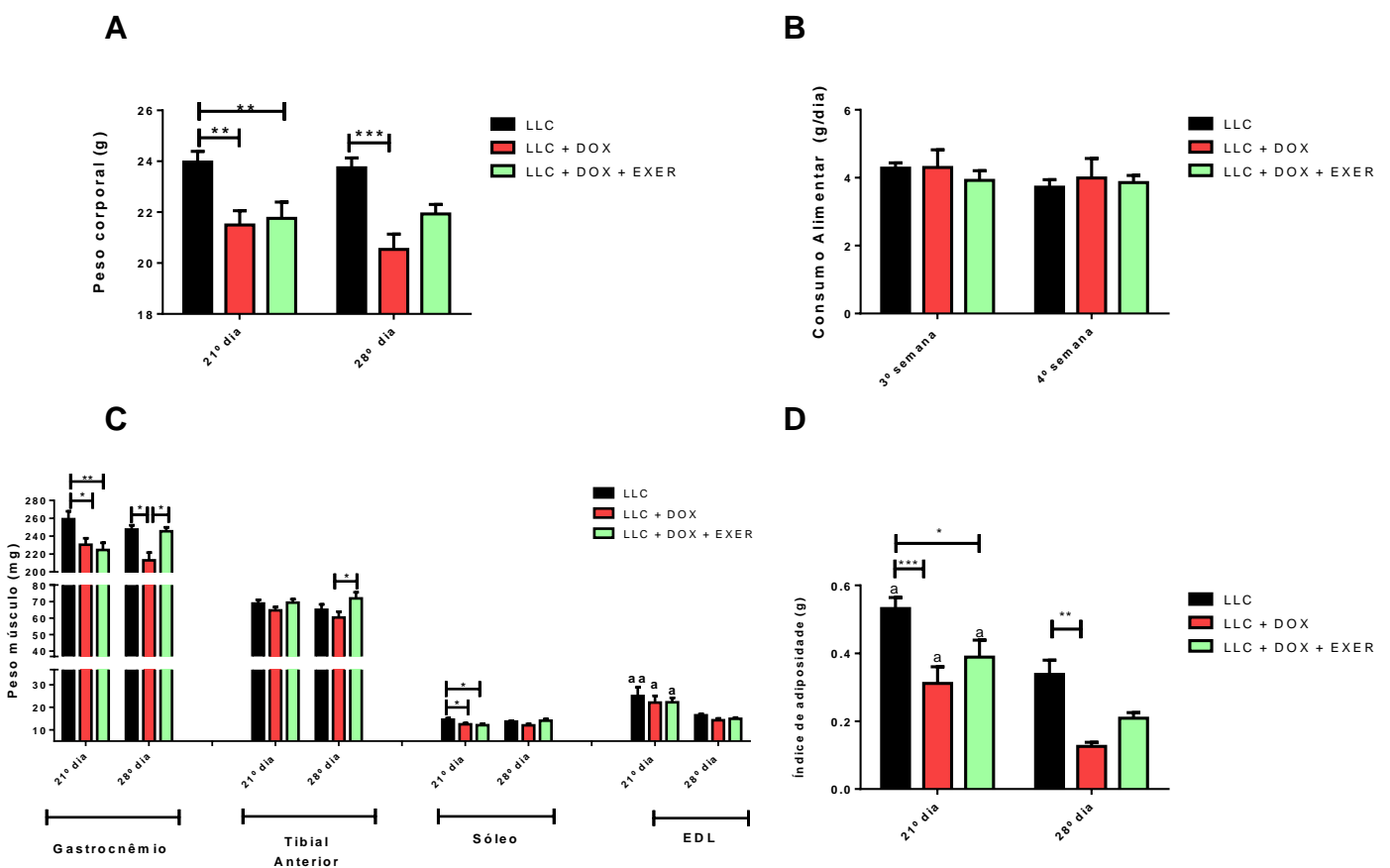


Figura 20. Peso corporal e do músculo esquelético de camundongos submetidos ao tratamento com doxorrubicina combinado ou não com exercício físico. A. Peso corporal (descontado o peso do tumor). $n=15-9$; B. Consumo alimentar. $n=9-5$. C. Peso do músculo. $n=15-9$; D. Índice de adiposidade - representa a soma do peso dos tecidos adiposos subcutâneo, mesentérico, epididimal e retroperitoneal. $n=15-9$. Valores representam a média e o erro padrão da análise dos dados obtidos. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ vs. LLC; *** $p < 0.001$ vs. LLC. LLC, Lewis Lung Carcinoma; DOX, doxorrubicina; EXER, exercício físico aeróbio moderado.

No período imediato à quimioterapia todos os grupos tratados com doxorrubicina apresentaram redução do peso do músculo gastrocnêmio (LLC vs. LLC+DOX e LLC vs. LLC+DOX+EXER, $p < 0.05$, 21º dia). Ao passo que com a interrupção da quimioterapia o grupo LLC+DOX permaneceu exibindo esta redução

(LLC vs. LLC+DOX, $p < 0.05$, 28^o dia), a retomada do peso deste tecido foi observada com o prosseguimento das sessões de exercício físico aeróbio (LLC+DOX vs. LLC+DOX+EXER, $p < 0.05$) (Figura 20 C).

O peso do músculo EDL foi somente influenciado pelo tempo com tumor e não pelos tratamentos. Todos os grupos experimentais (LLC, LLC+DOX e LLC+DOX+EXER) apresentaram redução no peso do músculo EDL mediante a semana adicional de protocolo (21^o dia vs. 28^o dia, $p < 0.05$) (Figura 20 C).

A administração de doxorrubicina, independentemente do exercício físico, reduziu a massa do músculo sóleo no período imediato à quimioterapia (LLC vs. LLC+DOX e LLC vs. LLC+DOX+EXER, $p < 0.05$, 21^o dia). Este efeito agudo do tratamento com doxorrubicina foi, no entanto, anulado pela interrupção da quimioterapia (28^o dia). Todos os grupos que receberam quimioterapia retornaram a valores semelhantes de peso do músculo sóleo ao patamar de animais portadores de tumor sem tratamento (LLC vs. LLC+DOX e LLC vs. LLC+DOX+EXER, $p > 0.05$) (Figura 20 C).

Não houve alteração do peso do músculo tibial anterior imediatamente à quimioterapia (21^o dia, $p > 0.05$). O grupo de animais que continuou se exercitando após a quimioterapia apresentou maior peso do músculo sóleo em comparação ao grupo que recebeu quimioterapia isolada (LLC+DOX vs. LLC+DOX+EXER, $p < 0.05$, 28^o dia) (Figura 20 C).

Imediatamente à quimioterapia, ambos os grupos tratados com doxorrubicina apresentaram redução do índice de adiposidade (LLC vs. LLC+DOX e LLC vs. LLC+DOX+EXER, $p < 0.05$, 21^o dia). E a presença do tumor por uma semana adicional reduziu a massa adiposa em todos os grupos (21^o vs. 28^o dia, $p < 0.05$). Esta redução, no entanto, foi em maior extensão no grupo que fez o uso isolado da doxorrubicina (LLC vs. LLC+DOX, $p < 0.01$, 28^o dia), de modo que a continuidade do exercício na interrupção da quimioterapia impediu uma queda mais acentuada no peso destes coxins adiposos (LLC vs. LLC+DOX+EXER, $p > 0.05$, 28^o dia) (Figura 20 D).

Imediatamente após a quimioterapia o desempenho em esteira rolante entre os grupos foi semelhante (21^o dia, $p > 0.05$). Com a interrupção da quimioterapia e continuidade do exercício físico, houve aumento na performance do teste em esteira no grupo LLC+DOX+EXER (21^o vs. 28^o dia, $p < 0.01$). Em contrapartida, o grupo de animais que recebeu quimioterapia e manteve-se sedentário, demonstraram menor performance em relação aos animais exercitados no período pós-quimioterápico

(LLC+DOX vs. LLC+DOX+EXER, $p < 0.05$, 28^o dia) (Figura 21 A). Não houve diferença em relação ao grupo que não recebeu tratamento (LLC vs. LLC+DOX+EXER, $p > 0.05$).

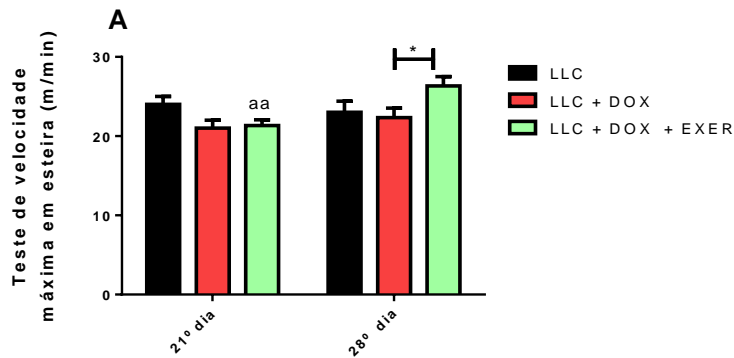


Figura 21. Desempenho no teste de esteira rolante de camundongos submetidos a quimioterapia associada ou não ao exercício físico. A. Velocidade obtida no teste máximo em esteira rolante durante e após a quimioterapia. $n = 9$. Os valores representam a média e o erro padrão da análise dos dados obtidos. * $p < 0,05$; aa – $p < 0,01$ em relação ao respectivo grupo no 28^o dia. LLC, Lewis Lung Carcinoma; DOX, doxorubicina; EXER, exercício físico aeróbio moderado.

Consequência do tratamento de curta duração com doxorubicina, as ativações de vias de sinalização atroficas tiveram aumento em sua grande maioria no período subsequente à suspensão da quimioterapia. Com exceção da expressão gênica de FoxO1, o restante dos genes avaliados (MurRF1, Atrogin1, FoxO3) aumentaram no período subsequente à descontinuação da utilização do fármaco (28^o dia) (Figura 22).

A abordagem quimioterápica isolada contribuiu para o aumento da expressão de Atrogin1 (LLC vs. LLC+DOX, $p < 0.01$, 28^o dia). Todavia o exercício físico durante e após a quimioterapia foi capaz de impedir este aumento (LLC+DOX vs. LLC+DOX+EXER, $p < 0.001$) (Figura 22 A).

Houve aumento na expressão de MuRF1 entre o 21^o e 28^o dia nos animais sedentários tratados com doxorubicina (LLC+DOX, $p < 0.01$). Ainda que animais exercitados também tenham recebido quimioterapia, estes não aumentaram a expressão de MuRF1 no período pós-quimioterápico (LLC vs. LLC+DOX e LLC+DOX vs. LLC+DOX+EXER, $p < 0.05$, 28^o dia) (Figura 22 B).

Houve aumento da expressão gênica de miostatina entre o 21^o e 28^o dia no grupo LLC+DOX ($p < 0.01$). Este aumento, no entanto, foi impedido pela combinação e continuidade do exercício físico aeróbio (LLC+DOX vs. LLC+DOX+EXER, $p < 0.05$, 28^o dia) (Figura 22 C).

Mesmo após interrupção da quimioterapia o grupo LLC+DOX aumentou a expressão de FoxO1 entre o 21º e 28º dia ($p < 0.001$). Enquanto foi observado diferença estatística entre os grupos LLC e LLC+DOX no 28º dia ($p < 0.05$), este efeito foi bloqueado nos animais que se exercitaram (LLC vs. LLC+DOX+EXER, $p > 0.05$, 28º dia). Distinto dos outros genes avaliados, evidenciamos que imediatamente após o tratamento quimioterápico, a combinação do exercício físico à doxorrubicina causou aumento da expressão de FoxO1 (LLC+DOX vs. LLC+DOX+EXER, $p < 0.05$, 21º dia) (Figura 22 D).

Conforme o protocolo experimental prosseguiu, o tratamento com doxorrubicina isolado (LLC+DOX) aumentou da expressão de FoxO3 (21º vs. 28º dia, $p < 0.01$). Uma semana após o fim do tratamento quimioterápico (28º dia), o grupo de camundongos que foi submetido à administração isolada com doxorrubicina apresentou aumento da expressão de FoxO3 (LLC vs. LLC+DOX, $p < 0.05$). A combinação ao exercício físico, no entanto, evitou este aumento (LLC vs. LLC+DOX+EXER, $p > 0.05$) (Figura 22 E). Não houve alteração na expressão gênica de IL-6 no músculo gastrocnêmio ao longo do protocolo experimental (Figura 22 F).

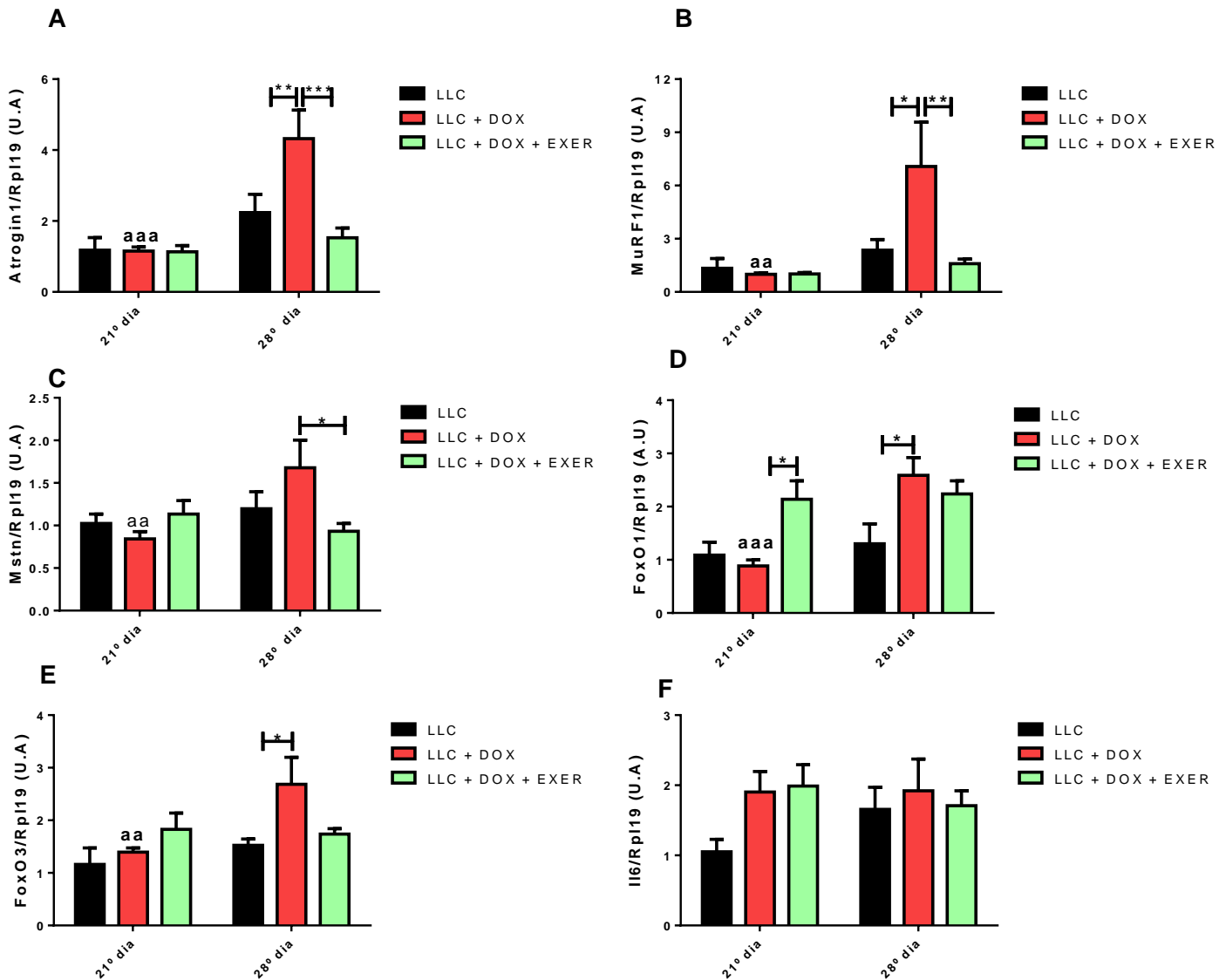


Figura 22. Efeito da combinação do exercício físico ao tratamento com doxorrubicina na expressão de proteínas ligadas à proteólise muscular. A. Expressão gênica de Atrogin1 no músculo gastrocnêmio; B. Expressão gênica de MurF1 no músculo gastrocnêmio; C. Expressão gênica de Miostatina no músculo gastrocnêmio; D. Expressão gênica de FoxO1 no músculo gastrocnêmio; E. Expressão gênica de FoxO3 no músculo gastrocnêmio; F. Expressão gênica de IL6 no músculo gastrocnêmio. Os valores representam a média e o erro padrão da análise dos dados obtidos. $n=5-6$. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; aa – $p < 0,01$ em relação ao respectivo grupo no 28º dia; aaa – $p < 0,001$ em relação ao respectivo grupo no 28º dia. LLC, Lewis Lung Carcinoma; DOX, doxorrubicina; EXER, exercício físico aeróbico moderado.

Não houve alteração na síntese proteica imediatamente ao término da quimioterapia (21º dia, $p > 0.05$) (Figura 23 A). Contudo, observamos uma resposta adversa tardia causada pela quimioterapia, uma semana após a interrupção do tratamento com doxorrubicina (28º dia). Houve redução da síntese proteica nos

animais que receberam intervenção quimioterápica isolada (LLC vs. LLC+DOX, $p < 0.01$) sendo que a combinação ao exercício físico não impediu esta resposta (LLC vs. LLC+DOX+EXER, $p < 0.01$) (Figura 23 B).

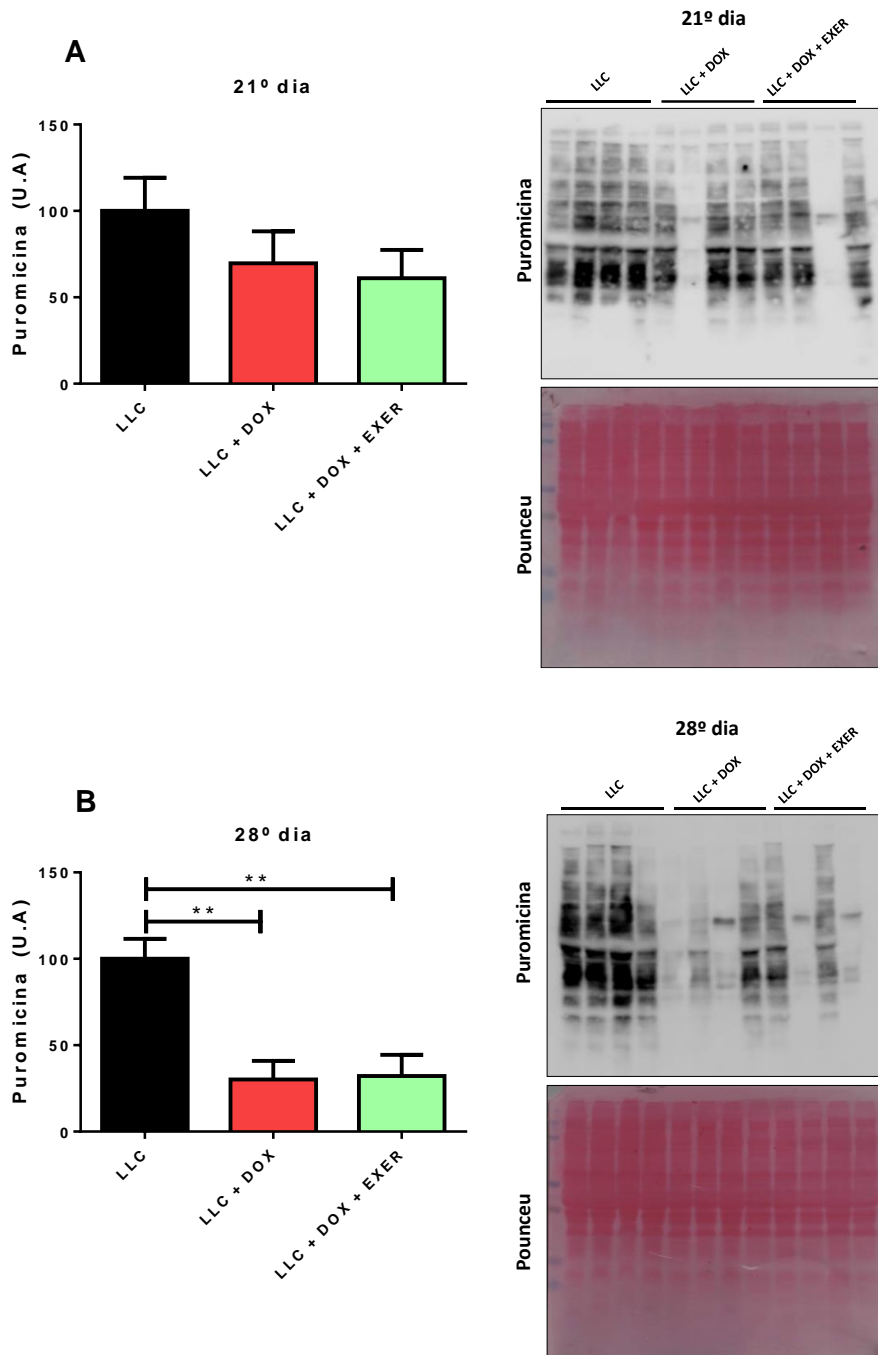


Figura 23. Avaliação da síntese proteica imediatamente e após a quimioterapia. A. Síntese proteica no músculo gastrocnêmio avaliado pelo método SUnSET ao término do ciclo quimioterápico; B. Síntese proteica no músculo gastrocnêmio avaliado pelo método SUnSET após a suspensão da quimioterapia. Os valores representam a média e o erro padrão da análise dos dados obtidos. $n=4$. ** $p < 0,01$. LLC, Lewis Lung Carcinoma; DOX, doxorubicina; EXER, exercício físico aeróbio moderado.

Não houve alteração na expressão proteica de Beclin, ATG3, ATG5 e ATG7 imediatamente ou uma semana após a última administração de doxorubicina (Figura 24 A/B).

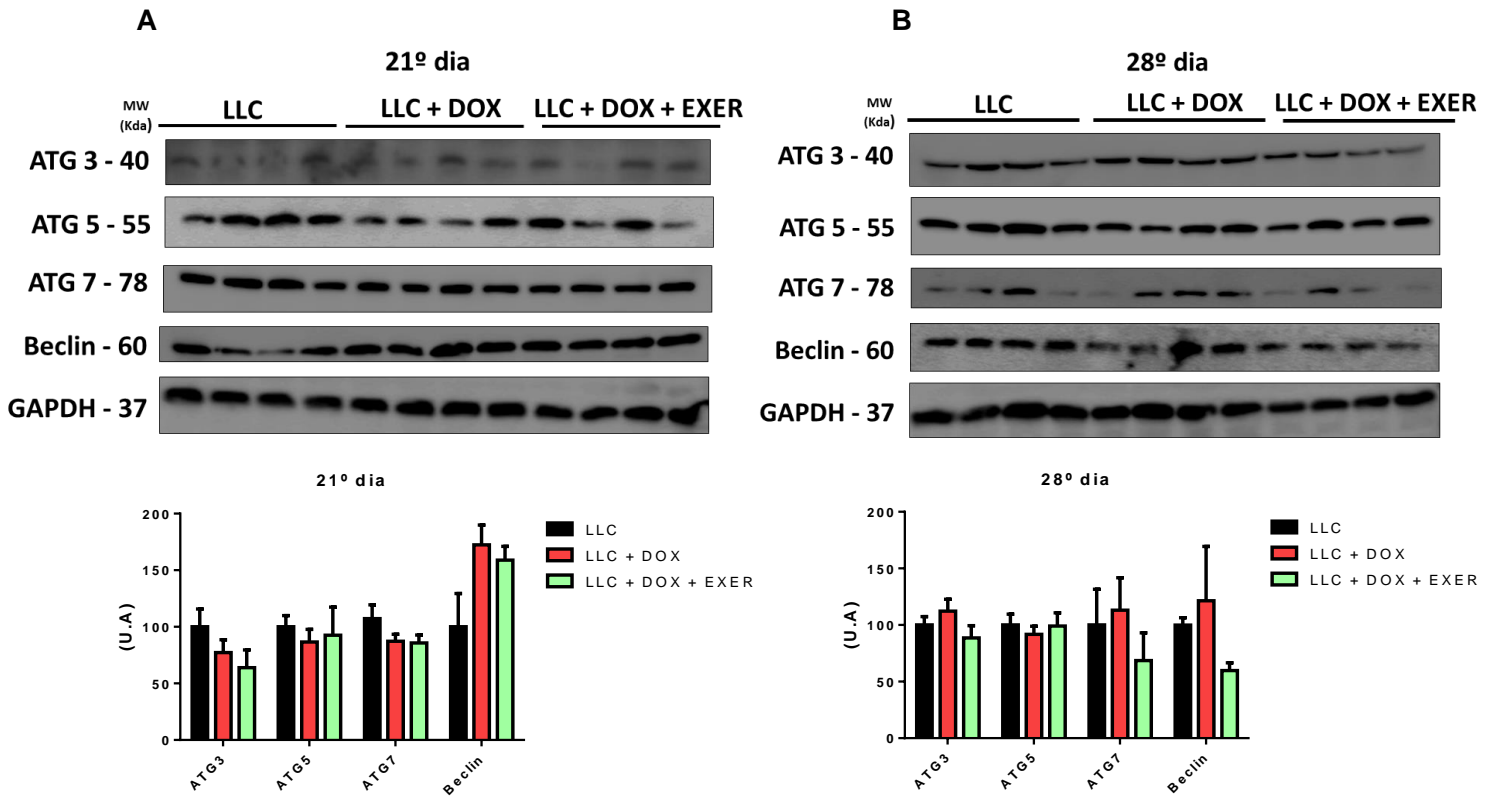


Figura 24. Sinalização autofágica no músculo gastrocnêmio. A. Expressão de proteínas envolvidas na ativação autofágica ao término do ciclo quimioterápico. B. Expressão de proteínas envolvidas na ativação autofágica uma semana após a suspensão da quimioterapia. Os valores representam a média e o erro padrão da análise dos dados obtidos. n=4. LLC, Lewis Lung Carcinoma; DOX, doxorubicina; EXER, exercício físico aeróbio moderado.

Determinamos a expressão de pNF- κ B do músculo gastrocnêmio, bem como a concentração de citocinas pró e anti-inflamatórias no homogenato muscular. Imediatamente após a quimioterapia (21º dia) houve diminuição da fosforilação de NF- κ B p65 nos animais tratados com doxorubicina (LLC vs. LLC+DOX e LLC vs. LLC+DOX+EXER, $p < 0.05$) (Figura 25 A), mas essa diferença não foi encontrada no protocolo de 28 dias (28º dia, $p > 0.05$) (Figura 25 B). No período imediato à quimioterapia (21º dia) no músculo gastrocnêmio não houve alteração concentração das citocinas IL-1 β , IL1-ra, TNF- α e IL-10 (Tabela 4).

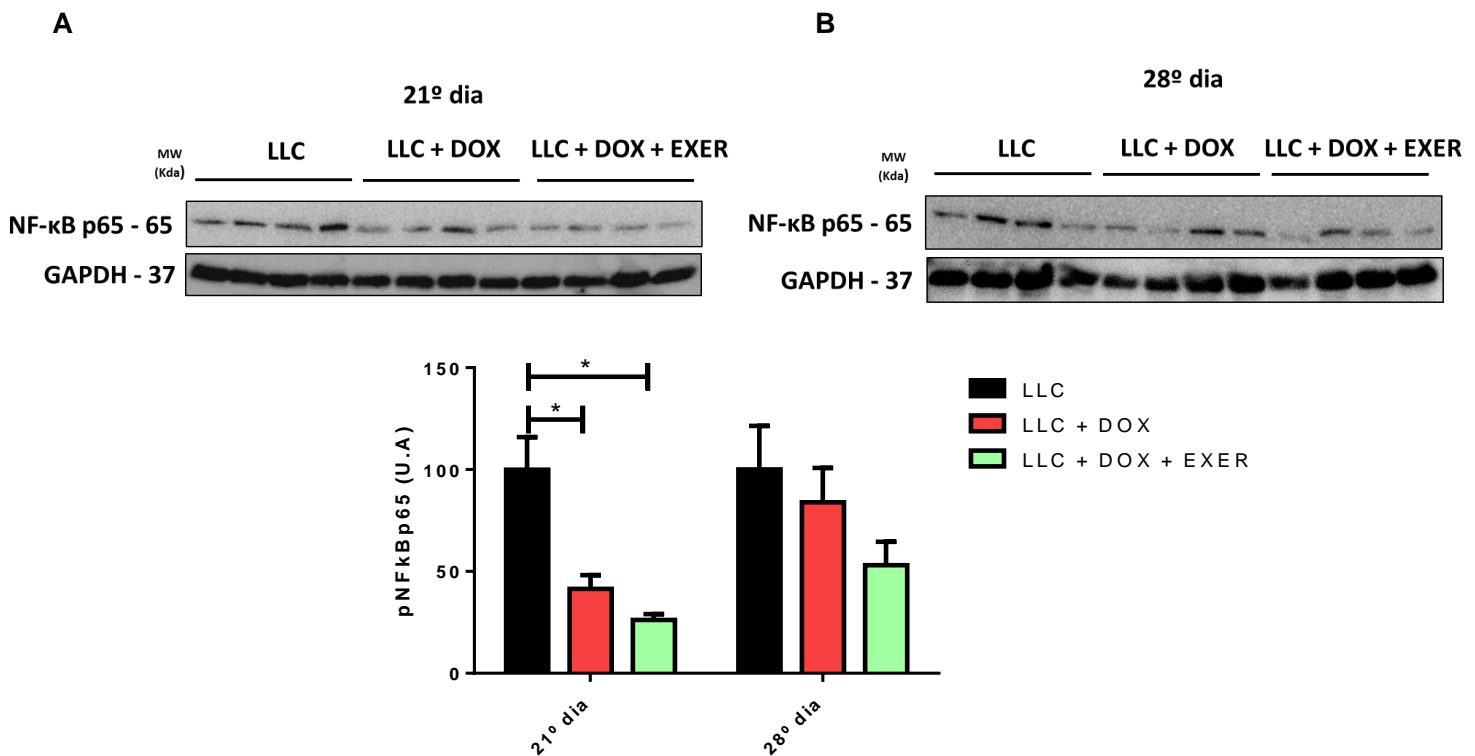


Figura 25. Avaliação da expressão de pNF-κBp65 músculo esquelético. A. Expressão proteica de pNF-κBp65 no músculo gastrocnêmio imediatamente após a quimioterapia. B. Expressão proteica de pNF-κB p65 no músculo gastrocnêmio no período pós-quimioterápico. Os valores representam a média e o erro padrão da análise dos dados obtidos. n=4. * $p < 0,05$. LLC, Lewis Lung Carcinoma; DOX, doxorubicina; EXER, exercício físico aeróbio moderado.

Tabela 4. Concentração de citocinas pró e anti-inflamatórias no músculo gastrocnêmio imediatamente ao tratamento quimioterápico

| Citocinas | Grupos experimentais | | |
|-----------|----------------------|------------------------|-----------------------------|
| | 21 dias | | |
| | LLC ⁽⁹⁾ | LLC+DOX ⁽⁷⁾ | LLC+DOX+EXER ⁽⁷⁾ |
| TNF-a | 38.48 ± 23.58 | 59.5 ± 23.08 | 60.42 ± 16.09 |
| IL-1β | 20.97 ± 12.92 | 10.43 ± 1.40 | 12.14 ± 2.61 |
| IL1-ra | 28.93 ± 8.32 | 67.29 ± 25.88 | 76.82 ± 26.16 |
| IL-10 | 30.07 ± 7.56 | 38.06 ± 9.70 | 69.39 ± 32.50 |

Valores expressos em pg/mg proteína. Valores representam a média e o erro padrão dos dados obtidos. n=9-7. LLC, Lewis Lung Carcinoma; DOX, doxorubicina; EXER, exercício físico aeróbio moderado.

Nossos resultados confirmaram os efeitos antitumorais da doxorubicina, levando à desaceleração do crescimento tumoral. Os grupos de animais tratados com

doxorubicina apresentaram redução do crescimento tumoral imediatamente ao término da intervenção quimioterápica (LLC vs. LLC+DOX e LLC+DOX+EXER, $p < 0.001$, 21^o dia). No entanto no período pós-quimioterápico, camundongos que receberam doxorubicina e permaneceram sedentários aumentaram a taxa de crescimento tumoral em uma proporção superior ao de animais que continuaram se exercitando (LLC+DOX vs. LLC+DOX+EXER, $p < 0.05$, 28^o dia). Ambos os grupos tratados com doxorubicina apresentaram menor volume tumoral no 28^o dia em relação ao grupo de animais que não receberam quimioterapia (LLC vs. LLC+DOX e LLC vs. LLC+DOX+EXER, $p < 0.001$) (Figura 26 A).

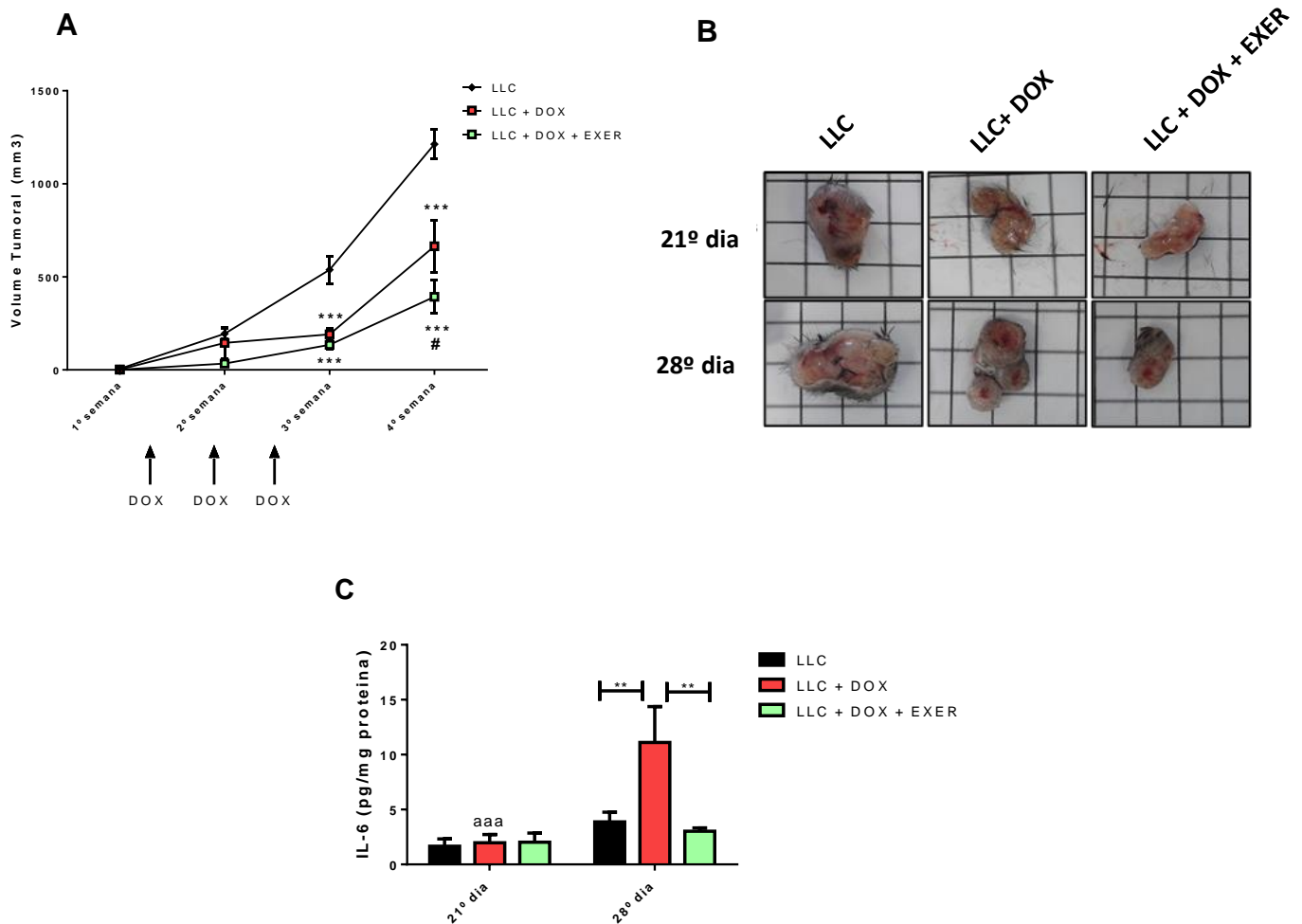


Figura 26. Efeito do tratamento quimioterápico com doxorubicina e da combinação ao exercício físico aeróbio no crescimento tumoral e na expressão de IL-6. A. Curva de crescimento tumoral (mm³). n= 20-18. *** $p < 0,001$ vs. LLC. # $p < 0,05$ vs. LLC + DOX. B. Imagens representativas do tamanho do tumor ao fim do ciclo quimioterápico e após uma semana C. Expressão proteica de IL-6 no homogenato tumoral (pg/mg proteína). n=5-6. ** $p < 0,01$; aaa – $p < 0,001$ em relação respectivo grupo no 28^o dia. Os valores representam as médias e erro padrão dos dados obtidos. Lewis Lung Carcinoma; DOX, doxorubicina; EXER, exercício físico aeróbio moderado.

Em virtude das alterações causadas pelos tratamentos no crescimento tumoral, avaliamos a expressão de proteínas que poderiam estar influenciando o atraso crescimento do tumoral causado pelo exercício físico quando a intervenção com doxorubicina foi finalizada. No período pós-quimioterápico houve aumento da expressão proteica de p53 e p53 acetilada (Lys379) no grupo que continuou se exercitando (LLC vs. LLC+DOX+EXER, $p < 0.05$, 28º dia). Neste instante não houve efeito causado pela quimioterapia isolada (LLC vs. LLC+DOX, $p > 0.05$, 28º dia) (Figura 27 A).

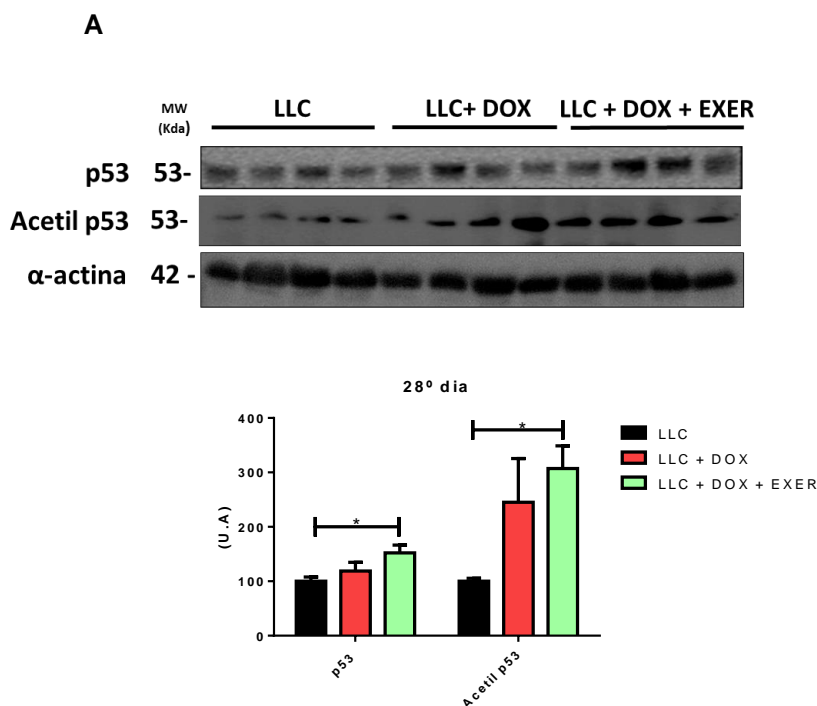


Figura 27. Expressão de p53 no homogenato tumoral após a suspensão da quimioterapia. A. Expressão proteica de p53 e Acetil p53 (Lys379). $n=4$. Valores representam a média e o erro padrão da análise dos dados obtidos. * $p < 0,05$. LLC, Lewis Lung Carcinoma; DOX, doxorubicina; EXER, exercício físico aeróbio moderado.

Não houve alteração na expressão gênica de Abcb1a, Abcg2 ou Abcc2, proteínas envolvidas no efluxo de doxorubicina ($p > 0.05$) (Figura 28 A/B/C).

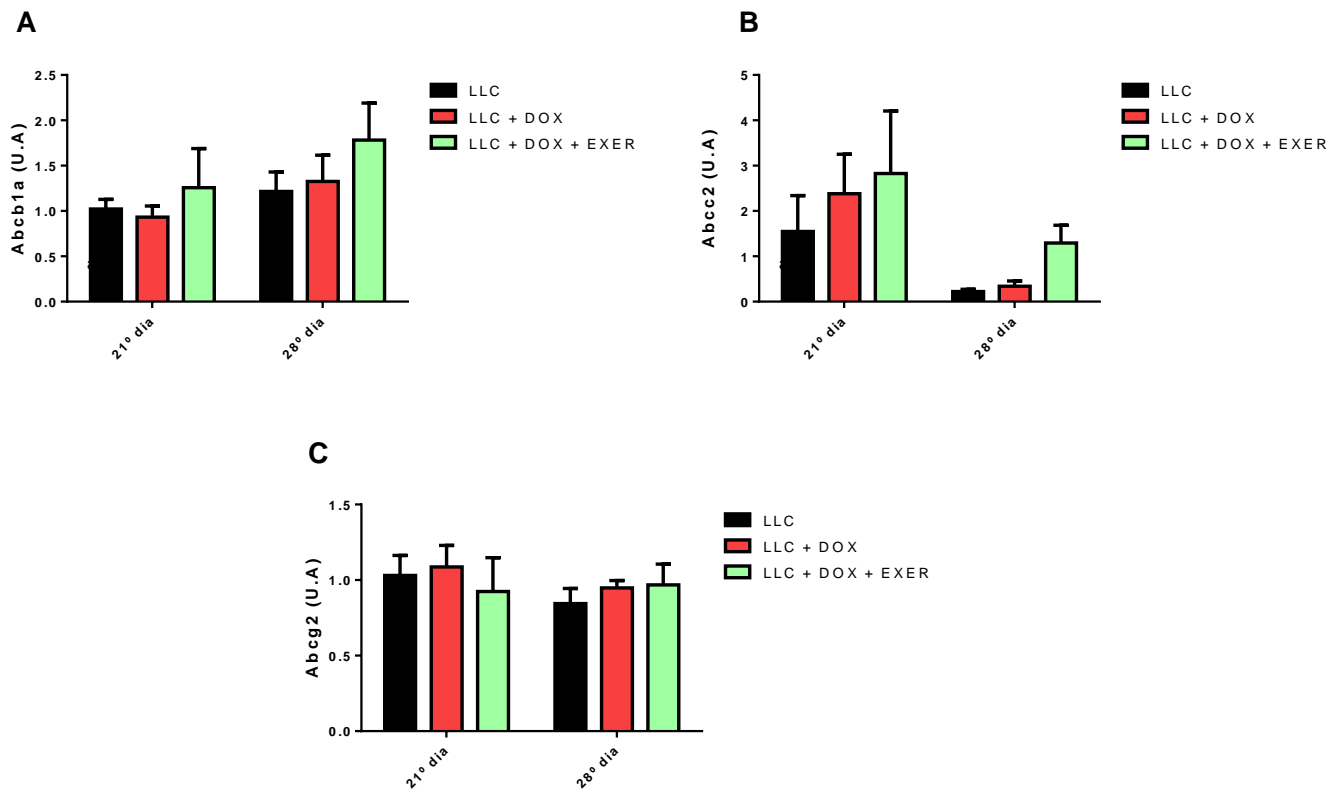


Figura 28. Avaliação da expressão gênica de proteínas transportadoras de doxorubicina imediatamente e após interrupção do tratamento quimioterápico. A. Expressão gênica de Abcb1a; B. Expressão gênica de Abcc2; C. Expressão gênica de Abcg2. Valores representam a média e o erro padrão da análise dos dados obtidos. n=5-6. LLC, Lewis Lung Carcinoma; DOX, doxorubicina; EXER, exercício físico aeróbico moderado.

No 28^o dia, a concentração de VEGF sérico foi reduzido com o tratamento quimioterápico isolado (LLC vs. LLC+DOX e LLC+DOX vs. LLC+DOX+EXER, $p < 0.05$), enquanto que a combinação com o exercício físico reestabeleceu a concentração de VEGF à uma condição semelhante ao do grupo que não se submeteu a nenhum tratamento (LLC vs. LLC+DOX+EXER, $p > 0.05$) (Figura 29 A). Inclusive a concentração de VEGF no homogenato tumoral foi maior nos animais que combinaram quimioterapia e exercício físico em relação aqueles que receberam a quimioterapia e permaneceram sedentários (LLC+DOX vs. LLC+DOX+EXER, $p < 0.05$) (Figura 29 B).

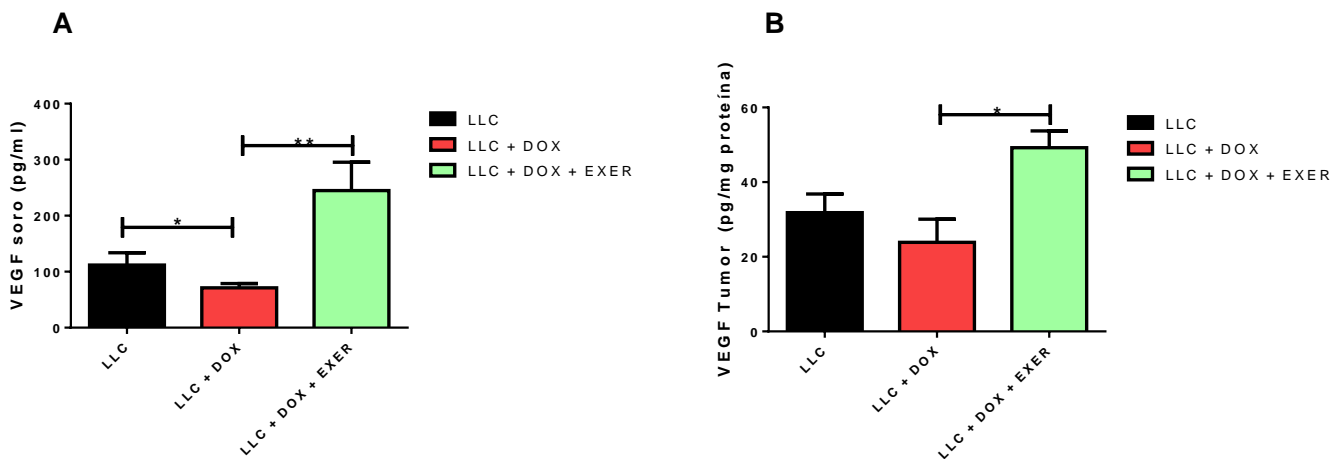


Figura 29. Efeito do tratamento com doxorrubicina e da combinação ao exercício físico aeróbio na expressão de VEGF. A. Concentração de VEGF no soro no 28º dia; B. Concentração de VEGF do tumor no 28º dia. Valores representam a média e o erro padrão da análise dos dados obtidos. n=5-6. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. LLC, Lewis Lung Carcinoma; DOX, doxorrubicina; EXER, exercício físico aeróbio moderado

Não houve alteração da expressão dos receptores de VEGF (Flt1, Flk1 e Flt4) no período imediato ou após uma semana após a interrupção da quimioterapia (Figura 30 A/B/C)

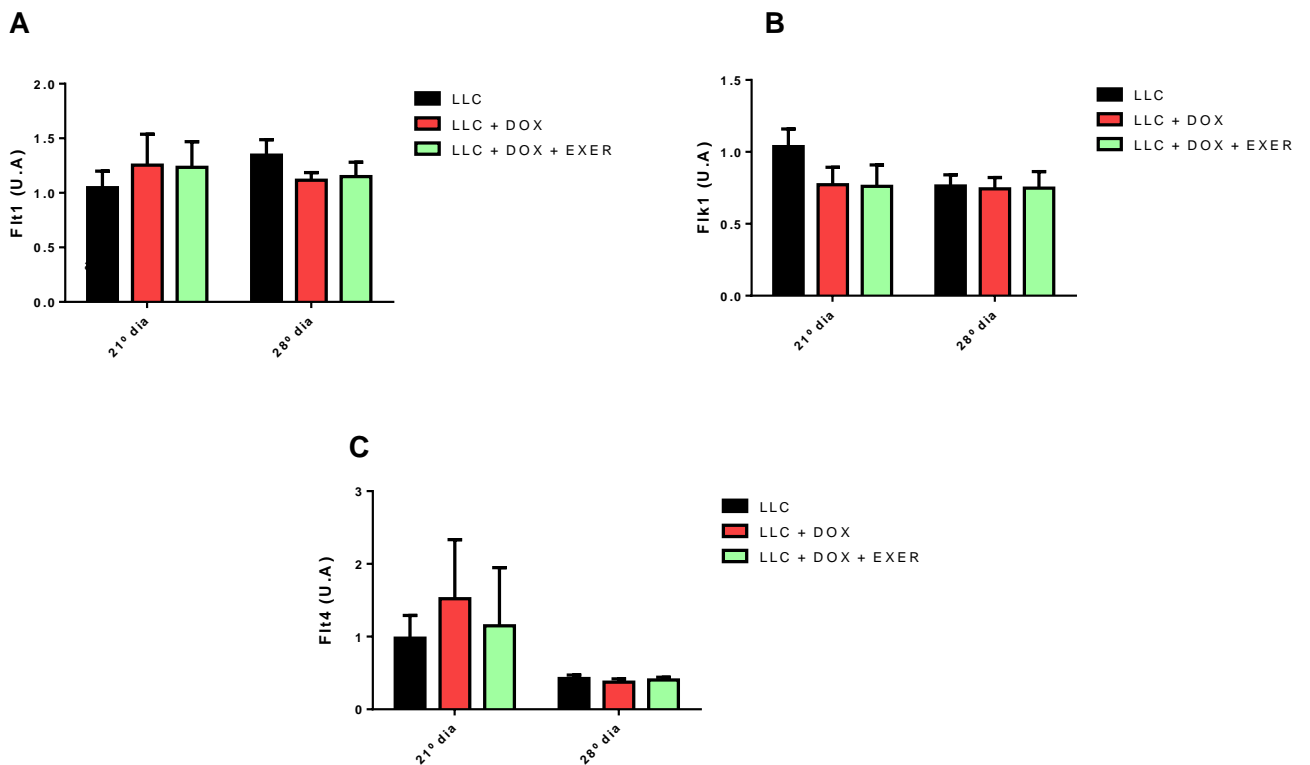


Figura 30. Expressão gênica dos receptores de VEGF no tumor. A. Expressão gênica de Flt1; B. Expressão gênica de Flk1; C. Expressão gênica de Flt4. Os valores representam a média e o erro padrão dos dados obtidos. n=5-6. LLC, Lewis Lung Carcinoma; DOX, doxorrubicina; EXER, exercício físico aeróbio moderado.

Adicionalmente avaliamos a expressão de citocinas no homogenato tumoral. A descontinuação do tratamento quimioterápico causou aumento da concentração de IL-6 no grupo LLC+DOX (21^o vs. 28^o dia, $p < 0.001$). Este aumento, no entanto, foi contido no grupo que se exercitou (LLC+DOX vs. LLC+DOX+EXER e LLC vs. LLC+DOX, $p < 0.01$, 28^o dia) (Figura 26 C).

A doxorubicina (LLC+DOX) reduziu a expressão de IL1-ra no homogenato tumoral imediatamente após o fim do ciclo quimioterápico em relação ao grupo que não recebeu tratamento (LLC vs. LLC+DOX, $p < 0.05$, 21^o dia), enquanto que este efeito não foi observado nos animais que combinaram o tratamento com doxorubicina ao exercício físico (LLC vs. LLC+DOX+EXER, $p > 0.05$, 21^o dia). Com a suspensão da quimioterapia (28^o dia), a concentração de IL1-ra no grupo LLC+DOX retornou à valores semelhantes ao grupo LLC ($p > 0.05$) (Tabela 5).

A concentração de MCP-1 foi somente influenciada pelo tempo com tumor (21^o dia vs. 28^o dia, $p < 0.001$) e não pelos tratamentos. Todos os grupos (LLC, LLC+DOX e LLC+DOX+EXER) apresentaram diminuição da expressão de MCP-1 com a semana adicional de protocolo experimental (Tabela 5). Não houve alteração na concentração de IL-10 e IL1- β ao longo do protocolo experimental (Tabela 5).

Tabela 5. Concentração de citocinas pró e anti-inflamatórias no homogenato tumoral imediatamente e após interrupção do tratamento quimioterápico.

| Citocina | Grupos experimentais | | | | | |
|--------------|----------------------|--------------------------|-----------------------------|--------------------|--------------------------|-----------------------------|
| | 21 dias | | | 28 dias | | |
| | LLC ⁽⁶⁾ | LLC + DOX ⁽⁶⁾ | LLC+DOX+EXER ⁽⁶⁾ | LLC ⁽⁶⁾ | LLC + DOX ⁽⁶⁾ | LLC+DOX+EXER ⁽⁵⁾ |
| MCP-1 | 39.87±3.29aaa | 36.27±3.49 aaa | 32.74±3.40 aaa | 13.51±0.74 | 19.48±3.15 | 14.95±1.92 |
| IL1- β | 239.47±22.65 | 170.17±46.99 | 229.00±24.28 | 210.28±30.50 | 192.23±8.19 | 262.16±12.09 |
| IL1-ra | 2302.90±303.04 | 1258.74±356.36* | 1456.32± 364.47 | 1826.03±233.96 | 1236.84±144.33 | 1427.77±60.06 |
| IL-10 | 5.71±1.02 | 6.08±0.54 | 8.27±2.47 | 6.78±1.50 | 10.15±3.37 | 6.48±1.50 |

Valores expressos em pg/mg proteína. Valores representam a média e o erro padrão dos dados obtidos. n=5-6. * - $p < 0.05$ vs. grupo LLC no mesmo período. aaa - $p < 0.001$ em relação respectivo grupo no 28^o dia. LLC, Lewis Lung Carcinoma; DOX, doxorubicina; EXER, exercício físico aeróbio moderado.

O exercício físico combinado à doxorubicina diminuiu a concentração de lactato sanguíneo no período imediato à quimioterapia em comparação ao grupo que recebeu o fármaco de maneira isolada (LLC+DOX vs. LLC+DOX+EXER, $p < 0.05$, 21^o dia). Esta diferença não foi estatisticamente significativa em relação aos animais que não receberam tratamento (LLC vs. LLC+DOX+EXER, $p > 0.05$) (Tabela 6). Houve, no entanto, um aumento tardio de lactato sanguíneo em ambos os grupos tratados

com doxorrubicina (21^o vs. 28^o dia, $p < 0.05$). Com a suspensão da quimioterapia (28^o dia) verificou-se o aumento da concentração de lactato sanguíneo nos grupos LLC+DOX e LLC+DOX+EXER em comparação ao grupo que não recebeu nenhum tratamento (LLC vs. LLC+DOX; LLC vs. LLC+DOX+EXER, $p < 0.05$, 28^o dia). O colesterol total e o triglicérides não foram alterados durante o protocolo experimental (Tabela 6).

Tabela 6. Parâmetros séricos

| Parâmetros | Grupos Experimentais | | | | | |
|------------------|----------------------|------------------------|-----------------------------|--------------------|------------------------|-----------------------------|
| | 21 dias | | | 28 dias | | |
| | LLC ⁽⁹⁾ | LLC+DOX ⁽⁹⁾ | LLC+DOX+EXER ⁽⁹⁾ | LLC ⁽⁶⁾ | LLC+DOX ⁽⁶⁾ | LLC+DOX+EXER ⁽⁶⁾ |
| Colesterol total | 174±19.52 | 160.9±21.7 | 132.5±18.53 | 126.62±17.54 | 122.22±4.78 | 120.95±4.54 |
| Triglicérides | 118.8±3.51 | 110.80±9.76 | 127.70±15.56 | 151.86±20.56 | 114.79±32.69 | 89.63±13.95 |
| Lactato | 47.87±3.42 | 55.48±7.81a | 35.37±1.56 #a | 46.16±4.15 | 103.47±7.18* | 88.31±4.49 * |

Valores expressos em mg/dl. Valores representam a média e o erro padrão dos dados obtidos. n=9-6. * - $p < 0.05$ em relação ao grupo LLC no mesmo período; # - $p < 0,05$ em relação ao grupo LLC + DOX no mesmo período; a - $p < 0,05$ em relação ao respectivo grupo no 28^o dia. LLC, Lewis Lung Carcinoma; DOX, doxorrubicina; EXER, exercício físico aeróbio moderado.

Embora tenhamos observado efeitos relativos ao tempo com tumor (21^o vs. 28^o dia, $p < 0.05$), não observamos diferenças relativas aos tratamentos (quimioterapia ou combinação quimioterapia e exercício físico) nos valores de glicemia. Camundongos que não receberam recurso terapêutico ou que mantiveram o exercício físico após a suspensão da quimioterapia (LLC e LLC+DOX+EXER) elevaram a glicemia entre o 21^o e 28^o dia ($p < 0.01$), enquanto isto não foi observado no grupo de animais submetidos apenas à quimioterapia (LLC, $p > 0.05$) (Tabela 7). Não houve alteração na insulinemia, tolerância à glicose ou sensibilidade à insulina durante o protocolo experimental (Figura 31 A/C).

Tabela 7. Concentração sérica de glicose e insulina

| Parâmetros | Grupos experimentais | | | | | |
|-----------------|----------------------|------------------------|-----------------------------|--------------------|------------------------|-----------------------------|
| | 21 dias | | | 28 dias | | |
| | LLC ⁽⁸⁾ | LLC+DOX ⁽⁸⁾ | LLC+DOX+EXER ⁽⁸⁾ | LLC ⁽⁸⁾ | LLC+DOX ⁽⁸⁾ | LLC+DOX+EXER ⁽⁸⁾ |
| Glicose(mg/dl) | 142.63±10.20aa | 116.7±7.34 | 117.89±6.55aa | 190.26±22.35 | 150,00±10.27 | 175.40±5.72 |
| Insulina(ng/ml) | 1.14±0.51 | 0.89±0.10 | 0.92±0.19 | 1.16±0.14 | 1.00±0.47 | 0.87±0.16 |

Valores representam a média e o erro padrão dos dados obtidos. n=8. aa - $p < 0,01$ em relação respectivo grupo no 28^o dia. LLC, Lewis Lung Carcinoma; DOX, doxorrubicina; EXER, exercício físico aeróbio moderado.

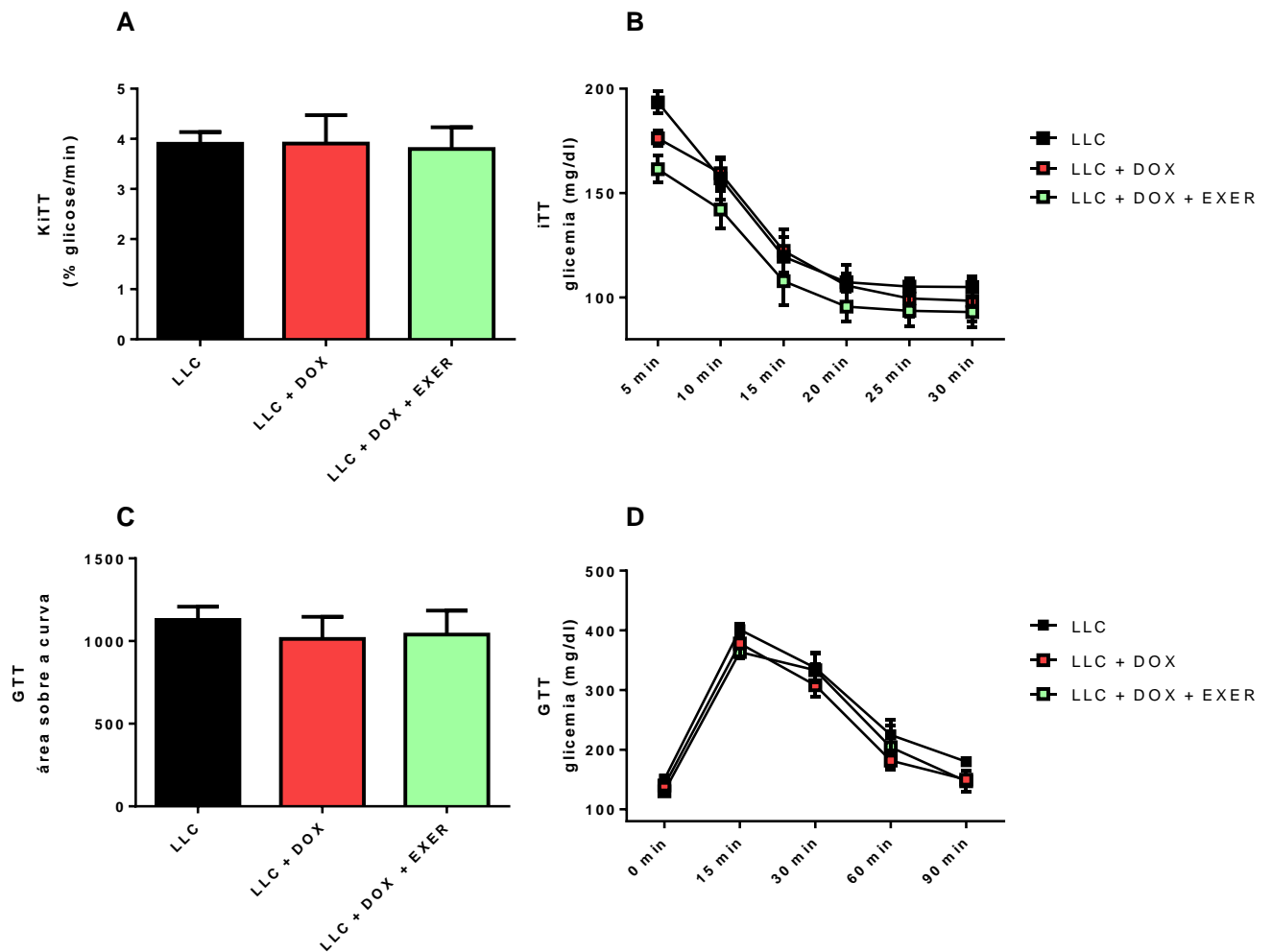


Figura 31. Determinação da sensibilidade e tolerância à glicose durante o tratamento quimioterápico com doxorubicina combinado ou não ao exercício físico. A. Constante de decaimento da glicose (KiTT); B. Curva da glicemia após injeção intraperitoneal de insulina (0,5 UI); C. Área sob curva do teste de tolerância à glicose; D. Curva da glicemia após injeção intraperitoneal de glicose (2 mg/kg peso corporal). Os valores representam a média e o erro padrão da análise dos dados obtidos. LLC, Lewis Lung Carcinoma; DOX, doxorubicina; EXER, exercício físico aeróbio moderado.

5. DISCUSSÃO

Nossos resultados demonstraram que o exercício físico aeróbio foi capaz de atenuar a atrofia muscular promovida pelo tratamento com doxorubicina apenas no período pós-quimioterápico. Esse efeito pode ser atribuído, em parte, à redução da expressão de proteínas relacionadas ao catabolismo muscular. Além disso, a combinação do exercício físico à administração quimioterápica não prejudicou os efeitos antitumorais desta antraciclina e, inclusive, minimizou a retomada da taxa de crescimento tumoral após a interrupção do tratamento farmacológico.

Embora simultaneamente, a associação da quimioterapia com o exercício físico ou metformina não tenham atenuado a perda muscular, houve minimização de outros efeitos adversos comuns relacionados à administração desta antraciclina. Ambas abordagens promoveram a normalização da concentração circulante de corticosterona, enquanto apenas a combinação ao exercício físico aeróbio reduziu a fadiga.

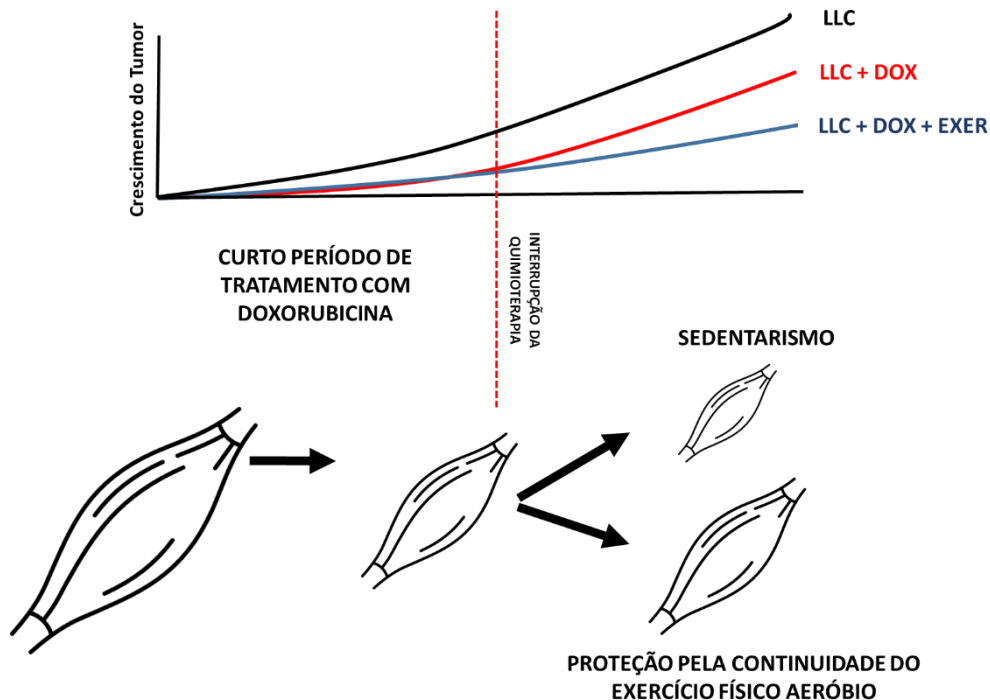


Figura 32. Efeito da continuidade do exercício físico após a interrupção da quimioterapia em um modelo experimental de câncer.

Apesar da doxorubicina ser um recurso terapêutico amplamente eficiente no tratamento de pacientes oncológicos, seu uso deve ser restrito devido aos efeitos colaterais adversos, que podem inclusive se manifestar subsequentemente ao término do ciclo quimioterápico (CHATTERJEE; ZHANG; HONBO; KARLINER, 2010; FAHIM; KATAYA; EL-KHARRAG; AMER *et al.*, 2011; LOPES; MEISEL; DIRNAGL; CARVALHO *et al.*, 2008; PUGAZHENDHI; EDISON; VELMURUGAN; JACOB *et al.*, 2018).

A manutenção do exercício físico sequencialmente ao tratamento com doxorubicina amenizou a perda de peso e a atrofia muscular. Mesmo após a suspensão da utilização do agente antineoplásico houve persistência na perda muscular, tendo essa sido minimizada pela continuidade do exercício físico. Isso ocorreu em parte pela redução do catabolismo muscular, sobretudo pela diminuição da sinalização do sistema ubiquitina-proteassoma. O emprego da doxorubicina em condições oncológicas é largamente descrito na literatura e, portanto, era de se esperar que levasse à redução do crescimento tumoral (BANDYOPADHYAY; WANG; AGYIN; TANG *et al.*, 2010; LI; WANG; ZHI; YOU *et al.*, 2018; MIRA; CARMONA-RODRIGUEZ; PEREZ-VILLAMIL; CASAS *et al.*, 2018; SPETH; VAN HOESEL; HAANEN, 1988; THORN; OSHIRO; MARSH; HERNANDEZ-BOUSSARD *et al.*, 2011).

Embora saibamos que o efeito tóxico da doxorubicina no tecido cardíaco possa ocorrer anos após o fim do tratamento, esse efeito em outros tecidos periféricos tem sido amplamente negligenciado (HEQUET; LE; MOULLET; PAULI *et al.*, 2004; LIPSHULTZ; COLAN; GELBER; PEREZ-ATAYDE *et al.*, 1991; MITRY; LAURENT; KEITH; SIRA *et al.*, 2020; STEINHERZ; STEINHERZ; TAN; HELLER *et al.*, 1991). Nossos achados levantam uma importante questão sobre o papel desempenhado pelo exercício físico durante e após o tratamento quimioterápico no gerenciamento da atrofia muscular persistente. Um fato que se destacou em nossos resultados foi este desdobramento da sinalização catabólica no músculo esquelético mesmo após a suspensão da doxorubicina.

Ao longo dos últimos anos tem sido amplamente discutido a contribuição dos quimioterápicos no desenvolvimento da atrofia muscular (COLETTI, 2018; DAMRAUER; STADLER; ACHARYYA; BALDWIN *et al.*, 2018; GILLIAM; MOYLAN; PATTERSON; SMITH *et al.*, 2012; GILLIAM; ST CLAIR, 2011; KAVAZIS; SMUDER; POWERS, 2014). E esse é realmente um tópico importante, visto que a perda muscular é uma condição recorrente em pacientes sob este tipo de tratamento.

Investigamos então o efeito de uma abordagem farmacológica e outra não farmacológica nos efeitos colaterais induzidos pelo tratamento quimioterápico com doxorrubicina. Na presença do tumor, avaliamos a importância da continuidade do exercício físico aeróbio após a suspensão da quimioterapia na proteção contra a perda muscular.

Dentre os fatores que contribuem para a atrofia muscular está o aumento da degradação de proteínas sarcoméricas pela ativação do sistema ubiquitina-proteassoma (BILODEAU; COYNE; WING, 2016). Atrogin1 e MuRF1 são ubiquitinas E3-ligases seletivamente expressas no músculo esquelético que tem importância na progressão da perda muscular. Elas promovem a poliubiquitinação de proteínas que devem ser direcionadas ao proteassoma 26S (BODINE; LATRES; BAUMHUETER; LAI *et al.*, 2001; GOMES; LECKER; JAGOE; NAVON *et al.*, 2001). Ao passo que a ubiquitinação é uma etapa essencial para a degradação de proteínas por esse sistema, a transcrição de Atrogin1 e MuRF1 é comumente utilizada como marcador-chave de sua ativação. O aumento da expressão de Atrogin1 e MuRF1 no músculo esquelético aumenta durante o desenvolvimento de atrofia muscular e, como tal, aumenta com a utilização da doxorrubicina (KAVAZIS; SMUDER; POWERS, 2014). Todavia não tenhamos observado esse efeito imediatamente ao término do ciclo quimioterápico, isto ocorreu subsequentemente, podendo ter sido relacionado ao uso de um modelo experimental de caquexia associada ao câncer ou pelo curto período de administração desta antraciclina. Em contrapartida ao efeito do uso isolado da doxorrubicina, a manutenção do exercício físico após a suspensão da quimioterapia reduziu a expressão tardia das ubiquitinas E3-ligases.

A regulação transcricional dos atrogenes está ligada ao aumento das vias de sinalizações catabólicas Akt/FoxO, (I κ B α) /nuclear factor kappa B (NF κ B) e MAPKs (GLASS, 2005). O papel central da via Akt/FoxO na proteólise deve-se ao fato de que sua sinalização leva ao aumento transcricional de ambas ubiquitina-ligases (MuRF1 e Atrogin1) (GLASS, 2005). A transcrição de FoxO 1/3 aumenta em diversas condições atroficas, sendo esse um processo altamente regulado (BROCCA; TONIOLO; REGGIANI; BOTTINELLI *et al.*, 2017; JUDGE; WU; BEHARRY; ROBERTS *et al.*, 2014; MILAN; ROMANELLO; PESCATORE; ARMANI *et al.*, 2015; O'NEILL; BHARDWAJ; PENNIMAN; KRUMPOCH *et al.*, 2019; REED; SANDESARA; SENF; JUDGE, 2012; SANDRI; SANDRI; GILBERT; SKURK *et al.*, 2004; SMITH; ALAMDARI; O'NEAL; GONNELLA *et al.*, 2010). Parte da proteólise gerada pelo

tratamento quimioterápico com doxorubicina se deve à ativação da proteólise via sinalização FoxO (KAVAZIS; SMUDER; POWERS, 2014). A diminuição da fosforilação de Akt favorece a translocação de FoxO 1/3 para o núcleo, levando à expressão das ubiquitina-ligases. Demonstramos que o tratamento transitório e de curta duração com doxorubicina gera o aumento tardio da transcrição de FoxO 1/3, sendo que, quando a quimioterapia é combinada com o exercício físico, esse efeito é suprimido.

Outro fator contribuinte para a atrofia muscular gerada pelo tratamento com doxorubicina foi o aumento da expressão de miostatina. A ativação da sinalização miostatina/SMAD é um dos principais reguladores negativos do crescimento muscular (LEE; MCPHERRON, 2001; SARTORI; MILAN; PATRON; MAMMUCARI *et al.*, 2009). O aumento da expressão desta proteína é verificado durante a perda muscular e tem sido inclusive alvo de inibidores farmacológicos na tentativa de preservar a massa magra durante o tratamento quimioterápico com doxorubicina (HULMI; NISSINEN; RASANEN; DEGERMAN *et al.*, 2018; LIU; QIAO; GE; SHANG *et al.*, 2019; NISSINEN; DEGERMAN; RASANEN; POIKONEN *et al.*, 2016). Portanto, a redução da transcrição de miostatina causada pelo exercício físico parece ser um dos aspectos centrais ligados à amenização da atrofia muscular de nosso modelo. Este efeito tem sido reportado tanto em modalidades de endurance quanto de resistência (HITTEL; AXELSON; SARNA; SHEARER *et al.*, 2010; LOUIS; RAUE; YANG; JEMIOLO *et al.*, 2007), onde um curto período de exercício físico de endurance reduz a expressão de miostatina proporcionada pelo tratamento com doxorubicina (KAVAZIS; SMUDER; POWERS, 2014).

O promotor do gene da miostatina é classicamente ativado por FoxO1 e proteínas SMAD (ALLEN; UNTERMAN, 2007). Além disso, glicocorticóides endógenos podem contribuir com o aumento da expressão de miostatina via interação com o elemento responsivo à glicocorticóides (GRE) (GILSON; SCHAKMAN; COMBARET; LAUSE *et al.*, 2007; QIN; DU; YANG; ZHANG *et al.*, 2013). O tratamento com doxorubicina aumenta a concentração circulante de corticosterona (DE LIMA JUNIOR; YAMASHITA; PIMENTEL; DE SOUSA *et al.*, 2016; KWATRA; JANGRA; MISHRA; SHARMA *et al.*, 2016; PREZIOSI; VACCA; RAGAZZONI; DEL CARMINE *et al.*, 1989). E este aumento na produção de glicocorticóides endógenos facilita a ativação de sinais catabólicos no músculo esquelético (BRAUN; MARKS, 2015; BRAUN; SZUMOWSKI; LEVASSEUR; GROSSBERG *et al.*, 2014; MA; MALLIDIS;

BHASIN; MAHABADI *et al.*, 2003). Tanto a combinação ao exercício físico quanto à metformina foram capazes de reduzir o aumento da concentração de corticosterona causado pelo uso de doxorubicina. Coletivamente estes dados nos sugerem que o bloqueio da expressão de miostatina pelo exercício físico se dá através da redução da concentração circulante de corticosterona e na atenuação da expressão de FoxO1.

Além de reduzir a síntese proteica, a transdução do sinal da ligação da miostatina em seu receptor proporciona o aumento da proteólise mediada via sistema ubiquitina-proteassoma. O aumento da transcrição de E3 ligases pela miostatina é regulado positivamente via sinalização Akt/FoxO (MCFARLANE; PLUMMER; THOMAS; HENNEBRY *et al.*, 2006). Assim, a repressão da transcrição dos atrogenes promovido pelo exercício físico após a interrupção da quimioterapia relaciona-se também à redução da expressão de miostatina. Além disso, foi demonstrada a inter-relação da contração muscular e miostatina (LESSARD; MACDONALD; PATHAK; HAN *et al.*, 2018). O processo contrátil proporcionado pelo exercício físico, sobretudo na modalidade de resistência de força, causa a ativação de JNK e consequente fosforilação de sítios alternativos em SMAD2. Essa sinalização não canônica impede a translocação do fator de transcrição SMAD2 para o núcleo, favorecendo os efeitos positivos do exercício físico sobre a massa muscular (LESSARD; MACDONALD; PATHAK; HAN *et al.*, 2018).

O desenvolvimento e a progressão do câncer são constantemente associados a um alto estado inflamatório (COUSSENS; WERB, 2002). O exercício físico, por outro lado, possui ação anti-inflamatória sistêmica, em especial se realizado em intensidade moderada (MURPHY; ENOS; VELAZQUEZ, 2015; PETERSEN; PEDERSEN, 2005). Nesse sentido, parte dos efeitos benéficos do exercício físico como coadjuvante no tratamento do câncer devem-se às alterações imunológicas e inflamatórias (MURPHY; ENOS; VELAZQUEZ, 2015). As citocinas pró-inflamatórias possuem um papel central na intensificação do processo de perda muscular durante o câncer, muitas das quais levam ao aumento da sinalização do fator de transcrição NF- κ B (LI; MALHOTRA; KUMAR, 2008).

A produção de fatores inflamatórios no câncer pelas células tumorais e pelo hospedeiro é um dos gatilhos para o desenvolvimento da atrofia muscular, dentre os quais a citocina IL-6 possui papel central. A IL-6 é uma das principais citocinas reguladoras da homeostase do músculo esquelético, no qual o aumento sustentado

de sua concentração leva ao balanço proteico negativo e progressão da caquexia associada ao câncer (CARSON; BALTGALVIS, 2010; NARSALE; CARSON, 2014).

Embora muitos tipos celulares possam sintetizar IL-6, evidências sugerem que o tumor é uma importante fonte produtora dessa citocina, o que conduz ao aumento de suas concentrações sistêmicas. Isso pode ser evidenciado em modelos animais, quando os tumores primários são cirurgicamente extraídos, isso gera diminuição da concentração de IL-6, e por consequência, a amenização do estado caquético (STRASSMANN; FONG; KENNEY; JACOB, 1992). Efeito semelhante é verificado mediante à utilização de anticorpos para antagonizar a ação desta citocina (ANDO; TAKAHASHI; KATO; KANEKO *et al.*, 2014). De maneira oposta, há um aprofundamento da perda muscular mediante o uso do modelo de carcinoma de pulmão Lewis (LLC) que expressa constitutivamente altas concentrações de IL-6 (ANDO; TAKAHASHI; KATO; KANEKO *et al.*, 2014; OHE; PODACK; OLSEN; MIYAHARA *et al.*, 1993).

Afora isso, o tratamento quimioterápico com doxorrubicina contribui para o aumento da concentração de IL-6 circulante, enquanto o exercício físico pode reduzir a transcrição de IL-6 no tumor (SAUTER; WOOD; WONG; IORDANOV *et al.*, 2011; SHALAMZARI; AGHA-ALINEJAD; ALIZADEH; SHAHBAZI *et al.*, 2014). Nossos dados demonstraram que o tratamento quimioterápico isolado promove o aumento da expressão de IL-6 no tumor no período pós-quimioterápico, o que foi amenizado pela continuidade do exercício físico aeróbio. O catabolismo muscular provocado pelo aumento de IL-6 advém da ligação desta citocina ao seu receptor e da ativação da cascata IL-6/gp130/STAT3 (MILLER; MCLEOD; ALHAYYANI; SZCZEPNY *et al.*, 2017). Durante a caquexia promovida pelo desenvolvimento tumoral em camundongos portadores de tumor de pulmão do tipo Lewis (LLC), a transdução do sinal via gp130 é importante para a ativação de FoxO3a, de modo que o bloqueio de STAT3 reduz a atrofia muscular (BONETTO; AYDOGDU; JIN; ZHANG *et al.*, 2012; PUPPA; GAO; NARSALE; CARSON, 2014).

A autofagia é um importante processo catabólico que envolve a degradação de componentes celulares velhos e em funcionamento inadequado (JIANG; MIZUSHIMA, 2014). Contribui e interage com os outros sistemas proteolíticos de forma que, o desbalanço nos níveis de autofagia no músculo esquelético podem favorecer a perda muscular e o desenvolvimento de doenças metabólicas associadas a este tecido (JIANG; MIZUSHIMA, 2014; NEEL; LIN; PESSIN, 2013). Muito embora Smuder *e cols.*

(2011a) tenham demonstrado a intensificação da autofagia como etapa essencial para o desenvolvimento da atrofia muscular induzida por doxorubicina, este aumento não foi observado em nossos modelos.

Resultados em animais sem tumor já suportavam a compreensão de que o tratamento com doxorubicina causaria redução na síntese proteica total (DE LIMA; DE SOUSA; DE; MARSHALL *et al.*, 2018). A administração crônica de doxorubicina reduz a cascata de sinalização de mTOR e a fosforilação de 4E-BP1 pelo aumento da proteína REDD1 (DICKINSON; D'LUGOS; MAHMOOD; ORMSBY *et al.*, 2017; NISSINEN; DEGERMAN; RASANEN; POIKONEN *et al.*, 2016). No entanto, a recuperação da massa magra no período pós quimioterápico em animais com tumor e exercitados não ocorreu em virtude do aumento da síntese proteica, que permaneceu reduzida. Por conseguinte, o efeito positivo da continuidade do exercício físico na minimização da atrofia muscular tardia foi consequência da redução da proteólise muscular.

A fadiga é freqüentemente relatada durante o tratamento com quimioterápicos, o que tem sido associado à piora da qualidade de vida dos pacientes (CAMPOS; HASSAN; RIECHELMANN; DEL GIGLIO, 2011). Durante o tratamento com doxorubicina isso é sustentado por prejuízos à função de músculos respiratórios e de músculos periféricos, além de ser resultado da própria cardiotoxicidade (GILLIAM; MOYLAN; CALLAHAN; SUMANDEA *et al.*, 2011; LEE; KWON; JANG; COSIO-LIMA *et al.*, 2020; MONTALVO; DOERR; MIN; SZETO *et al.*, 2020; POWERS; DUARTE; LE NGUYEN; HYATT, 2019). No músculo estriado esquelético isto ocorre de diferentes maneiras, como por alterações metabólicas, aumento do dano mitocondrial e comprometimento da junção neuromuscular junção neuromuscular (DE LIMA JUNIOR; YAMASHITA; PIMENTEL; DE SOUSA *et al.*, 2016; GUIGNI; FIX; BIVONA; PALMER *et al.*, 2019; HUERTAS; MORTON; HINKEY; ICHINOSEKI-SEKINE *et al.*, 2020; TARPEY; AMORESE; BALESTRIERI; FISHER-WELLMAN *et al.*, 2019).

A fim de gerir esta condição, o exercício físico tem sido prescrito como uma abordagem terapêutica não farmacológica (JOHNSSON; DEMMELMAIER; SJOVALL; WAGNER *et al.*, 2019; WITLOX; HIENSCH; VELTHUIS; STEINS BISSCHOP *et al.*, 2018). O exercício físico durante o tratamento com doxorubicina proporciona melhora da função mitocondrial, aumento da sinalização via AMPk e preservação da junção neuromuscular (DE LIMA; DE SOUSA; DE; MARSHALL *et al.*, 2018; HUERTAS; MORTON; HINKEY; ICHINOSEKI-SEKINE *et al.*, 2020; SMUDER, 2019). Apesar dos

efeitos tóxicos da quimioterapia no músculo esquelético, o tratamento com doxorrubicina não interrompe completamente a eficiência adaptativa deste tecido (BREDAHL; PFANNENSTIEL; QUINN; HAYWARD *et al.*, 2016). A continuidade do exercício físico após a interrupção da quimioterapia, mesmo quando iniciado em condições extremamente adversas, como a que representa a presença do tumor, não impediu, por exemplo, a melhora do desempenho no teste em esteira.

Efeitos no tumor

O uso simultâneo da doxorrubicina e do exercício físico não afetou a capacidade tumoricida deste agente antineoplásico. Contudo, com a abordagem farmacológica isolada, o crescimento tumoral foi intensificado com a suspensão do ciclo quimioterápico. Essa retomada foi atenuada pela inclusão de sessões de exercício físico durante e após a quimioterapia, o que sinaliza a valiosa contribuição dessa abordagem.

Alguns estudos demonstraram o efeito inibitório do exercício físico sobre o crescimento tumoral e o desenvolvimento de metástases (PEDERSEN; IDORN; OLOFSSON; LAUENBORG *et al.*, 2016; WESTERLIND; MCCARTY; SCHULTHEISS; STORY *et al.*, 2003; ZIELINSKI; MUENCHOW; WALLIG; HORN *et al.*, 2004). Isto seria possível em razão da redução da sinalização proliferativa de células tumorais, ativação de supressores de crescimento e de vias de morte celular, normalização da vascularização tumoral, e de uma capacidade reduzida de metástases e invasão de células cancerosas (RUIZ-CASADO; MARTIN-RUIZ; PEREZ; PROVENCIO *et al.*, 2017).

Além disso, já foi demonstrado que o exercício físico pode aumentar, ou pelo menos não interferir, no efeito tumoricida da doxorrubicina (JONES; EVES; COURNEYA; CHIU *et al.*, 2005; STURGEON; SCHADLER; MUTHUKUMARAN; DING *et al.*, 2014). Demonstramos aqui que, embora o exercício físico não tenha sensibilizado a quimioterapia, a manutenção dessa atividade após o ciclo quimioterápico minimizou o crescimento tumoral e que foi acompanhada por aumento da expressão do supressor tumoral p53. *In vitro*, o uso do soro condicionado de indivíduos exercitados em células de câncer de próstata (LNCaP), aumenta a atividade de p53, o que leva à ativação dos mecanismos de morte celular programada

e redução do crescimento celular (LEUNG; ARONSON; NGO; GOLDING *et al.*, 2004). De modo semelhante, no modelo de carcinoma de pele induzido por éster de forbol (TPA), o exercício físico alterou a expressão de proteínas alvo de p53, estando este efeito ligado à supressão da sinalização de IGF-1 (YU; KING; EWERT; SU *et al.*, 2016). Alguns estudos ainda sugerem que a atividade antineoplásica da doxorrubicina pode ser potencializada pela combinação de agentes que contribuam com a ativação da proteína p53, tal como a curcumina, a quercetina, a selenocistina e o IFN- α (LI; YUAN; ZHAO; WANG *et al.*, 2018; SEN; MOHANTY; HOSSAIN; BHATTACHARYYA *et al.*, 2011; WANG; ZHANG; LIU; SHARMA *et al.*, 2012; YUAN; ZHU; HUANG; SHENG *et al.*, 2007).

A acetilação de p53 é uma das modificações pós-traducionais que ocorre em resposta a uma diversidade de sinais de estresse celular (ITO; LAI; ZHAO; SAITO *et al.*, 2001; REED; QUELLE, 2014). Isto ocorre por meio de reações enzimáticas reversíveis e que tem como resultado a estabilização da proteína e o aumento transcricional de seus genes alvos (TANG; ZHAO; CHEN; ZHAO *et al.*, 2008). E na medida em que isso ocorre, estimulam-se diversos processos celulares ligados à função de p53 na supressão tumoral. Por outro lado, o bloqueio da acetilação de p53 impede a interrupção do ciclo celular e a apoptose mediada por essa proteína (TANG; ZHAO; CHEN; ZHAO *et al.*, 2008). O aumento da acetilação, especificamente no sítio de lisina 382 (correspondente em camundongos ao sítio de lisina 379), melhora a interação da proteína com a sequência de DNA alvo (SAKAGUCHI; HERRERA; SAITO; MIKI *et al.*, 1998). Evidenciamos aqui que a continuidade do exercício físico após a quimioterapia levou ao aumento de p53.

A massa tumoral é formada por um nicho altamente heterogêneo de células com diferentes assinaturas fenotípicas e moleculares que, dentre outras coisas, fomenta a possibilidade de recidiva tumoral (D'ALTERIO; SCALA; SOZZI; ROZ *et al.*, 2020; HANAHAN; WEINBERG, 2011; KUMAR; CRAMER; DAHAJ; SUNDARAM *et al.*, 2019). Após a quimioterapia, nichos de células remanescentes, antes quiescentes ou em baixo estado proliferativo, se ativam. As células-tronco tumorais (CSCs) possuem um importante papel neste contexto (VIDAL; RODRIGUEZ-BRAVO; GALSKEY; CORDON-CARDO *et al.*, 2014; YANG; SHI; ZHAO; XU *et al.*, 2020). Durante a formação do carcinoma de pulmão Lewis, foram identificados grupos de células com características de células-tronco tumorais (CSCs), que eventualmente não são completamente eliminados com a administração da doxorrubicina (KHOO; GRENCI;

LIM; LIM *et al.*, 2019; ZHANG; FAN; YAO; MA *et al.*, 2012; ZHENG; CUI; XU; BRABANT *et al.*, 2010). Devido à sua capacidade em resistir ao tratamento quimioterápico, as CSCs podem contribuir com o reinício do desenvolvimento tumoral, e subsequentemente, cooperar diferenciando-se em outros tipos celulares necessários para o crescimento da massa tumoral (LATHIA; LIU, 2017; PHI; SARI; YANG; LEE *et al.*, 2018).

A IL-6 possui um importante papel no processo regulatório da carcinogênese e no desenvolvimento da quimiorresistência à drogas, agindo diretamente sobre células tumorais e influenciando outros tipos celulares do microambiente tumoral, tal como a proliferação de CSCs (KUMARI; DWARAKANATH; DAS; BHATT, 2016; ZHANG; DUAN; TSAI; KENG *et al.*, 2016; ZHENG; CHEN; LI; WEI *et al.*, 2019). Um dos fatores que contribuem com a expansão das CSCs é à ativação da cascata de sinalização IL-6/JAK/STAT3, que por sua vez, pode ser antagonizada pelo uso de inibidores para IL-6 (LIU; LIN; HSU; SU *et al.*, 2015; YI; CHO; CHO; JO *et al.*, 2012; YING; TSUJII; KONDO; HAYASHI *et al.*, 2015; ZHONG; DAVIS; OUZOUNOVA; CARRASCO *et al.*, 2016). Ademais, há um fino balanço dinâmico entre os diferentes tipos celulares que compõe o tumor, no qual células não tronco-tumorais (NCSCs) podem também se diferenciar em CSCs (VAN NEERVEN; TIEKEN; VERMEULEN; BIJLSMA, 2016). O aumento de IL-6 por NCSCs está entre os fatores que contribuem para que isso ocorra (ILIOPOULOS; HIRSCH; WANG; STRUHL, 2011). Com a suspensão do tratamento quimioterápico houve a retomada do crescimento tumoral, efeito este que foi minimizado pela manutenção das sessões de exercício físico aeróbio, e que foi acompanhada pela redução da expressão de IL-6 no tumor. É possível que a combinação do exercício físico ao tratamento quimioterápico possa induzir a diminuição das CSCs e/ou que a redução da sinalização de IL-6 atenua a expansão da população de CSCs.

Um dos elementos que influenciam o fluxo de nutrientes, oxigênio e de drogas para o microambiente tumoral é a angiogênese (CARMELIET; JAIN, 2000; DE PALMA; BIZIATO; PETROVA, 2017). Fatores de crescimento e a hipóxia estão entre os principais contribuintes para o aumento dessa sinalização que se encontra aumentada em diversas condições fisiológicas e patológicas, inclusive durante o câncer (FOUAD; AANEI, 2017).

Uma série de estudos indicam que o exercício físico seria capaz de reduzir a hipóxia, melhorar a perfusão tumoral e que, em razão de uma melhor vascularização,

haveria uma distribuição mais satisfatória de fármacos neste microambiente (JONES; ANTONELLI; MASKO; BROADWATER *et al.*, 2012; JONES; FELLS; WEST; ALLEN *et al.*, 2013; JONES; VIGLIANTI; TASHJIAN; KOTHADIA *et al.*, 2010; TSAI; KUO; CHANG; WU, 2013). O remodelamento da rede vascular pelo treinamento físico demonstrou ser necessário para a melhora do fluxo de doxorubicina para o tumor, visto que mudanças de tensão vascular causadas pelo exercício físico agudo são insuficientes para promoverem este efeito (SCHADLER; THOMAS; GALIE; BHANG *et al.*, 2016). Nossos resultados demonstraram que durante o período pós-quimioterápico, o exercício físico aumentou a expressão de VEGF em comparação ao grupo que recebeu o tratamento quimioterápico e permaneceu sedentário.

O VEGF é um fator de crescimento de grande importância na sinalização pró-angiogênica, sendo que o aumento de sua expressão no tumor frente ao exercício físico está ligado à ativação da cascata de sinalização de PI3K/mTOR, MEK/MAPK e na estabilização de HIF-1 α (JONES; ANTONELLI; MASKO; BROADWATER *et al.*, 2012). Muito além do que apenas o aumento na rede de vascularização, a realização do exercício físico aeróbico durante o câncer possibilitaria uma perfusão mais funcional de tumores sólidos (BETOF; LASCOLA; WEITZEL; LANDON *et al.*, 2015; MCCULLOUGH; STABLEY; SIEMANN; BEHNKE, 2014). Esta melhora na entrega do quimioterápico para o tumor não implica, no entanto, que outras estruturas do organismo como o coração, pulmão, fígado e músculo esquelético serão afetadas negativamente (MORRELL; ALVAREZ-FLOREZ; ZHANG; KLEINERMAN *et al.*, 2019).

Já a interação das antraciclinas com o DNA compromete a atividade transcricional de HIF-1 α (LEE; QIAN; REY; WEI *et al.*, 2009), o que contribui com a redução da expressão de VEGF no tumor durante o tratamento com doxorubicina (DUYNDAM; VAN BERKEL; DORSMAN; ROCKX *et al.*, 2007; LEE; QIAN; REY; WEI *et al.*, 2009). É importante enfatizar que no modelo de carcinoma de pulmão Lewis (LLC) não há associação entre o tamanho do tumor e a expressão do VEGF (TSAI; CHANG; KUO; WU, 2011), e que, células de câncer de mama resistentes ao tratamento com doxorubicina (MCF-7/ADR) tem a expressão de VEGF reduzida (KIM; CHO; KIM; PARK *et al.*, 2008; TSAI; CHANG; KUO; WU, 2011).

O aumento da hipóxia é considerado um mau prognóstico durante o câncer, visto que está ligado à maior agressividade tumoral, metástases e quimiorresistência (BARRAK; KHAJAH; LUQMANI, 2020; KOH; LEMOS; LIU; POWIS, 2011; PETROVA;

ANNICCHIARICO-PETRUZZELLI; MELINO; AMELIO, 2018). Células epiteliais de câncer de ovário, resistentes ao tratamento com docetaxel e cisplatina, apresentam redução da expressão de fatores pró-angiogênicos (NUSRAT; BELOTTE; FLETCHER; MEMAJ *et al.*, 2016). No câncer de pulmão de células não pequenas a baixa expressão de VEGF é um dos indicativos da resistência ao tratamento com doxorubicina (VOLM; KOOMAGI; MATTERN, 1996).

A influência do exercício físico no desenvolvimento da resistência ao quimioterápico é uma área ainda pouco explorada. Após serem desafiadas pela quimioterapia, células tumorais podem vir a desenvolver resistência ao fármaco utilizado (ABUHAMMAD; ZIHLIF, 2013; COX; WEINMAN, 2016; RAGUZ; YAGUE, 2008). Este fator torna a abordagem terapêutica cada vez mais desafiadora, visto que a responsividade ao tratamento por estas células torna-se cada vez menos eficiente. O influxo de doxorubicina na célula ocorre primordialmente por difusão passiva, sendo necessário que se alcance uma concentração crítica para que surjam efeitos citotóxicos (SPEELMANS; STAFFHORST; DE KRUIJFF; DE WOLF, 1994). No entanto, esse acúmulo vai depender também da dinâmica de efluxo do agente quimioterápico. O desenvolvimento da resistência ao quimioterápico está relacionado a um conjunto de condições, dentre os quais uma das primeiras variações que ocorrem é o aumento da expressão das proteínas transportadoras de cassetes de ligação de ATP (GOTTESMAN; FOJO; BATES, 2002). Múltiplas proteínas pertencentes à superfamília ABC (*ATP-binding cassette*) têm sido descritas como responsáveis pelo efluxo de doxorubicina. Células tumorais resistentes à doxorubicina apresentam evidenciado aumento da expressão de ABCB1 (Mdr1), ABCC1 (Mrp), ABCC2 (Mrp2), e ABCG2 (Mrx) (ABUHAMMAD; ZIHLIF, 2013; COLE; BHARDWAJ; GERLACH; MACKIE *et al.*, 1992; RUGGERI; SCIACCHITANO; VITARELLI; TRIMARCHI *et al.*, 2006; SHEN; CHU; BENCE; BAILEY *et al.*, 2008). No entanto, um curto período de tratamento com doxorubicina não alterou a expressão dos transportadores Abcc1 (Mrp1) e Abcc2 (Mrp2) no adenocarcinoma mamário de roedores (PARRY; HAYWARD, 2015). De modo semelhante, o tratamento quimioterápico transitório e de curta duração de nosso modelo experimental foi insuficiente para modificar a expressão das proteínas responsáveis pelo efluxo de doxorubicina no carcinoma de pulmão Lewis, cujas análises foram realizadas ao final do ciclo quimioterápico e uma semana após.

O tratamento quimioterápico isolado, apesar de diminuir a taxa de crescimento tumoral, reduziu também a sobrevida. A condição tumoral pré-existente foi essencial para que o aumento da mortalidade ocorresse, visto que não houve letalidade em animais sem tumor e submetidos à mesma condição experimental. A necessidade da presença do tumor para a redução da sobrevida nos confirmou a condição extremamente desgastante ao organismo que é a presença da doença, mas também de seu tratamento.

Nesse sentido, a diminuição da sobrevida causada pela quimioterapia pode ser resultado do efeito adicional da toxicidade em tecidos periféricos e da já existente desregulação da homeostase corporal pela presença do tumor. A ativação da sinalização inflamatória é um ponto-chave no desenvolvimento do câncer de pulmão (COUSSENS; WERB, 2002; GOMES; TEIXEIRA; COELHO; ARAUJO *et al.*, 2014). Quando células LLC que expressam altas concentrações de IL-6 são utilizadas como modelo experimental de câncer, além de se desenvolver um estado caquético mais profundo, ocorre redução na sobrevida (OHE; PODACK; OLSEN; MIYAHARA *et al.*, 1993).

Por sua vez, o exercício físico tem sido utilizado como uma abordagem não farmacológica durante o câncer, regulando a sintomatologia da doença, de seu tratamento e protegendo contra uma condição de incapacidade ou morte prematura (HOJMAN; GEHL; CHRISTENSEN; PEDERSEN, 2018). Alterações no sistema cardiovascular são comumente descritas durante o tratamento com doxorubicina e associada à alta letalidade (SCOTT; KHAKOO; MACKEY; HAYKOWSKY *et al.*, 2011; VOLKOVA; RUSSELL, 2011), tendo o exercício físico importante papel preventivo contra a cardiotoxicidade induzido por antraciclinas (CHEN; WU; MIDDLEKAUFF; NGUYEN, 2017; SMUDER, 2019).

Mais recentemente tem se discutido a importância da manutenção da massa magra durante o uso de agentes quimioterápicos, visto que, com frequência, a perda muscular resulta em menor sobrevida e redução da tolerância ao tratamento (CHOI; OH; KIM; LEE *et al.*, 2015; DALY; NI BHUACHALLA; POWER; CUSHEN *et al.*, 2018; PIN; COUCH; BONETTO, 2018; RYAN; PRADO; SULLIVAN; POWER *et al.*, 2019). Assim o estabelecimento de estratégias que minimizem a perda muscular é de grande importância, sobretudo quando o tratamento quimioterápico pode contribuir com esta condição. Uma vez que a continuidade do tratamento quimioterápico nem sempre é viável ou indicada, demonstramos aqui que a continuidade do exercício físico após a

interrupção da quimioterapia pode evitar o aprofundamento da perda muscular, a redução da sobrevida e a retomada do crescimento tumoral.

6. CONCLUSÃO

Nossos resultados indicam que o exercício físico contribui para a normalização da concentração de corticosterona e protege contra a redução do desempenho físico causado pelo tratamento com doxorrubicina. Embora durante a abordagem simultânea a perda muscular não tenha sido evitada, isto ocorreu quando houve continuidade das sessões de exercício físico aeróbio após o fim do ciclo quimioterápico. Mesmo com a suspensão do uso da doxorrubicina houve aumento da sinalização catabólica no músculo gastrocnêmio, efeito que foi minimizado em camundongos exercitados. Já a administração de metformina apenas normalizou a concentração circulante de corticosterona.

Além disso, a combinação do exercício físico ao tratamento com doxorrubicina não prejudicou os efeitos antitumorais desse agente quimioterápico, inclusive evitando a redução da sobrevida. A retomada de crescimento tumoral mais lenta no grupo exercitado após a suspensão da quimioterapia foi acompanhada pelo aumento na expressão de p53 e redução na expressão de IL-6 no carcinoma de pulmão Lewis.

REFERÊNCIAS¹

- ABUHAMMAD, S.; ZIHLIF, M. Gene expression alterations in doxorubicin resistant MCF7 breast cancer cell line. **Genomics**, 101, n. 4, p. 213-220, Apr 2013.
- ADAMSEN, L.; QUIST, M.; ANDERSEN, C.; MOLLER, T. *et al.* Effect of a multimodal high intensity exercise intervention in cancer patients undergoing chemotherapy: randomised controlled trial. **BMJ**, 339, p. b3410, 2009.
- AJZASHOKOUHI, A. H.; BOSTAN, H. B.; JOMEZADEH, V.; HAYES, A. W. *et al.* A review on the cardioprotective mechanisms of metformin against doxorubicin. **Hum Exp Toxicol**, 39, n. 3, p. 237-248, Mar 2020.
- ALHOWAIL, A.; ALMOGBEL, Y. Metformin administration increases the survival rate of doxorubicin-treated mice. **Pharmazie**, 74, n. 12, p. 737-739, Dec 1 2019.
- ALLEN, D. L.; UNTERMAN, T. G. Regulation of myostatin expression and myoblast differentiation by FoxO and SMAD transcription factors. **Am J Physiol Cell Physiol**, 292, n. 1, p. C188-199, Jan 2007.
- ANDO, K.; TAKAHASHI, F.; KATO, M.; KANEKO, N. *et al.* Tocilizumab, a proposed therapy for the cachexia of Interleukin6-expressing lung cancer. **PLoS One**, 9, n. 7, p. e102436, 2014.
- ANISIMOV, V. N.; BERSTEIN, L. M.; EGORMIN, P. A.; PISKUNOVA, T. S. *et al.* Effect of metformin on life span and on the development of spontaneous mammary tumors in HER-2/neu transgenic mice. **Exp Gerontol**, 40, n. 8-9, p. 685-693, Aug-Sep 2005.
- AOI, W.; NAITO, Y.; TAKAGI, T.; TANIMURA, Y. *et al.* A novel myokine, secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC), suppresses colon tumorigenesis via regular exercise. **Gut**, 62, n. 6, p. 882-889, Jun 2013.
- ARGILES, J. M.; BUSQUETS, S.; STEMMLER, B.; LOPEZ-SORIANO, F. J. Cancer cachexia: understanding the molecular basis. **Nat Rev Cancer**, 14, n. 11, p. 754-762, Nov 2014.
- BANDYOPADHYAY, A.; WANG, L.; AGYIN, J.; TANG, Y. *et al.* Doxorubicin in combination with a small TGFbeta inhibitor: a potential novel therapy for metastatic breast cancer in mouse models. **PLoS One**, 5, n. 4, p. e10365, Apr 28 2010.
- BARACOS, V. E.; MARTIN, L.; KORC, M.; GUTTRIDGE, D. C. *et al.* Cancer-associated cachexia. **Nat Rev Dis Primers**, 4, p. 17105, Jan 18 2018.

¹ De acordo com: Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24p

BARRAK, N. H.; KHAJAH, M. A.; LUQMANI, Y. A. Hypoxic environment may enhance migration/penetration of endocrine resistant MCF7- derived breast cancer cells through monolayers of other non-invasive cancer cells in vitro. **Sci Rep**, 10, n. 1, p. 1127, Jan 24 2020.

BARRET, M.; ANTOUN, S.; DALBAN, C.; MALKA, D. *et al.* Sarcopenia is linked to treatment toxicity in patients with metastatic colorectal cancer. **Nutr Cancer**, 66, n. 4, p. 583-589, 2014.

BARRETO, R.; MANDILI, G.; WITZMANN, F. A.; NOVELLI, F. *et al.* Cancer and Chemotherapy Contribute to Muscle Loss by Activating Common Signaling Pathways. **Front Physiol**, 7, p. 472, 2016.

BATATINHA, H. A.; LIMA, E. A.; TEIXEIRA, A. A.; SOUZA, C. O. *et al.* Association Between Aerobic Exercise and Rosiglitazone Avoided the NAFLD and Liver Inflammation Exacerbated in PPAR-alpha Knockout Mice. **J Cell Physiol**, 232, n. 5, p. 1008-1019, May 2017.

BENJAMIN, R. S.; WIERNIK, P. H.; BACHUR, N. R. Adriamycin chemotherapy--efficacy, safety, and pharmacologic basis of an intermittent single high-dosage schedule. **Cancer**, 33, n. 1, p. 19-27, Jan 1974.

BETOF, A. S.; LASCOLA, C. D.; WEITZEL, D.; LANDON, C. *et al.* Modulation of murine breast tumor vascularity, hypoxia and chemotherapeutic response by exercise. **J Natl Cancer Inst**, 107, n. 5, May 2015.

BILODEAU, P. A.; COYNE, E. S.; WING, S. S. The ubiquitin proteasome system in atrophying skeletal muscle: roles and regulation. **Am J Physiol Cell Physiol**, 311, n. 3, p. C392-403, Sep 1 2016.

BIONDO, L. A.; BATATINHA, H. A.; SOUZA, C. O.; TEIXEIRA, A. A. S. *et al.* Metformin Mitigates Fibrosis and Glucose Intolerance Induced by Doxorubicin in Subcutaneous Adipose Tissue. **Front Pharmacol**, 9, p. 452, 2018.

BLANDINO, G.; VALERIO, M.; CIOCE, M.; MORI, F. *et al.* Metformin elicits anticancer effects through the sequential modulation of DICER and c-MYC. **Nat Commun**, 3, p. 865, May 29 2012.

BODINE, S. C.; BAEHR, L. M. Skeletal muscle atrophy and the E3 ubiquitin ligases MuRF1 and MAFbx/atrogen-1. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, 307, n. 6, p. E469-484, Sep 15 2014.

BODINE, S. C.; LATRES, E.; BAUMHUETER, S.; LAI, V. K. *et al.* Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. **Science**, 294, n. 5547, p. 1704-1708, Nov 23 2001.

BOLEN, S.; FELDMAN, L.; VASSY, J.; WILSON, L. *et al.* Systematic review: comparative effectiveness and safety of oral medications for type 2 diabetes mellitus. **Ann Intern Med**, 147, n. 6, p. 386-399, Sep 18 2007.

BONETTO, A.; AYDOGDU, T.; JIN, X.; ZHANG, Z. *et al.* JAK/STAT3 pathway inhibition blocks skeletal muscle wasting downstream of IL-6 and in experimental cancer cachexia. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, 303, n. 3, p. E410-421, Aug 1 2012.

BONORA, E.; MANICARDI, V.; ZAVARONI, I.; COSCELLI, C. *et al.* Relationships between insulin secretion, insulin metabolism and insulin resistance in mild glucose intolerance. **Diabete Metab**, 13, n. 2, p. 116-121, Apr 1987.

BOOTH, F. W.; ROBERTS, C. K.; LAYE, M. J. Lack of exercise is a major cause of chronic diseases. **Compr Physiol**, 2, n. 2, p. 1143-1211, Apr 2012.

BOWER, J. E. Cancer-related fatigue--mechanisms, risk factors, and treatments. **Nat Rev Clin Oncol**, 11, n. 10, p. 597-609, Oct 2014.

BRAUN, T. P.; MARKS, D. L. The regulation of muscle mass by endogenous glucocorticoids. **Front Physiol**, 6, p. 12, 2015.

BRAUN, T. P.; SZUMOWSKI, M.; LEVASSEUR, P. R.; GROSSBERG, A. J. *et al.* Muscle atrophy in response to cytotoxic chemotherapy is dependent on intact glucocorticoid signaling in skeletal muscle. **PLoS One**, 9, n. 9, p. e106489, 2014.

BRAY, F.; FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; SIEGEL, R. L. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA Cancer J Clin**, 68, n. 6, p. 394-424, Nov 2018.

BREDAHL, E. C.; PFANNENSTIEL, K. B.; QUINN, C. J.; HAYWARD, R. *et al.* Effects of Exercise on Doxorubicin-Induced Skeletal Muscle Dysfunction. **Med Sci Sports Exerc**, 48, n. 8, p. 1468-1473, Aug 2016.

BROCCA, L.; TONIOLO, L.; REGGIANI, C.; BOTTINELLI, R. *et al.* FoxO-dependent atrogenes vary among catabolic conditions and play a key role in muscle atrophy induced by hindlimb suspension. **J Physiol**, 595, n. 4, p. 1143-1158, Feb 15 2017.

CAI, H.; EVERETT, R. S.; THAKKER, D. R. Efficacious dose of metformin for breast cancer therapy is determined by cation transporter expression in tumours. **Br J Pharmacol**, 176, n. 15, p. 2724-2735, Aug 2019.

CAI, H.; ZHANG, Y.; HAN, T. K.; EVERETT, R. S. *et al.* Cation-selective transporters are critical to the AMPK-mediated antiproliferative effects of metformin in human breast cancer cells. **Int J Cancer**, 138, n. 9, p. 2281-2292, May 1 2016.

CAMPOS, M. P.; HASSAN, B. J.; RIECHELMANN, R.; DEL GIGLIO, A. Cancer-related fatigue: a practical review. **Ann Oncol**, 22, n. 6, p. 1273-1279, Jun 2011.

CARMELIET, P.; JAIN, R. K. Angiogenesis in cancer and other diseases. **Nature**, 407, n. 6801, p. 249-257, Sep 14 2000.

CARSON, J. A.; BALTGALVIS, K. A. Interleukin 6 as a key regulator of muscle mass during cachexia. **Exerc Sport Sci Rev**, 38, n. 4, p. 168-176, Oct 2010.

CHATTERJEE, K.; ZHANG, J.; HONBO, N.; KARLINER, J. S. Doxorubicin cardiomyopathy. **Cardiology**, 115, n. 2, p. 155-162, 2010.

CHEN, J. J.; WU, P. T.; MIDDLEKAUFF, H. R.; NGUYEN, K. L. Aerobic exercise in anthracycline-induced cardiotoxicity: a systematic review of current evidence and future directions. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, 312, n. 2, p. H213-H222, Feb 1 2017.

CHOI, Y.; OH, D. Y.; KIM, T. Y.; LEE, K. H. *et al.* Skeletal Muscle Depletion Predicts the Prognosis of Patients with Advanced Pancreatic Cancer Undergoing Palliative Chemotherapy, Independent of Body Mass Index. **PLoS One**, 10, n. 10, p. e0139749, 2015.

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Anal Biochem**, 162, n. 1, p. 156-159, Apr 1987.

CICERO, A. F.; TARTAGNI, E.; ERTEK, S. Metformin and its clinical use: new insights for an old drug in clinical practice. **Arch Med Sci**, 8, n. 5, p. 907-917, Nov 9 2012.

COLE, S. P.; BHARDWAJ, G.; GERLACH, J. H.; MACKIE, J. E. *et al.* Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. **Science**, 258, n. 5088, p. 1650-1654, Dec 4 1992.

COLETTI, D. Chemotherapy-induced muscle wasting: an update. **Eur J Transl Myol**, 28, n. 2, p. 7587, Apr 24 2018.

COURNEYA, K. S.; SELLAR, C. M.; STEVINSON, C.; MCNEELY, M. L. *et al.* Randomized controlled trial of the effects of aerobic exercise on physical functioning and quality of life in lymphoma patients. **J Clin Oncol**, 27, n. 27, p. 4605-4612, Sep 20 2009.

COUSSENS, L. M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature**, 420, n. 6917, p. 860-867, Dec 19-26 2002.

COX, J.; WEINMAN, S. Mechanisms of doxorubicin resistance in hepatocellular carcinoma. **Hepat Oncol**, 3, n. 1, p. 57-59, Jan 1 2016.

COYLE, C.; CAFFERTY, F. H.; VALE, C.; LANGLEY, R. E. Metformin as an adjuvant treatment for cancer: a systematic review and meta-analysis. **Ann Oncol**, 27, n. 12, p. 2184-2195, Dec 2016.

CURRIE, C. J.; POOLE, C. D.; GALE, E. A. The influence of glucose-lowering therapies on cancer risk in type 2 diabetes. **Diabetologia**, 52, n. 9, p. 1766-1777, Sep 2009.

- D'ALTERIO, C.; SCALA, S.; SOZZI, G.; ROZ, L. *et al.* Paradoxical effects of chemotherapy on tumor relapse and metastasis promotion. **Semin Cancer Biol**, 60, p. 351-361, Feb 2020.
- D'LUGOS, A. C.; FRY, C. S.; ORMSBY, J. C.; SWEENEY, K. R. *et al.* Chronic doxorubicin administration impacts satellite cell and capillary abundance in a muscle-specific manner. **Physiol Rep**, 7, n. 7, p. e14052, Apr 2019.
- DALY, L. E.; NI BHUACHALLA, E. B.; POWER, D. G.; CUSHEN, S. J. *et al.* Loss of skeletal muscle during systemic chemotherapy is prognostic of poor survival in patients with foregut cancer. **J Cachexia Sarcopenia Muscle**, 9, n. 2, p. 315-325, Apr 2018.
- DAMRAUER, J. S.; STADLER, M. E.; ACHARYYA, S.; BALDWIN, A. S. *et al.* Chemotherapy-induced muscle wasting: association with NF-kappaB and cancer cachexia. **Eur J Transl Myol**, 28, n. 2, p. 7590, Apr 24 2018.
- DANTZIG, A. H.; LAW, K. L.; CAO, J.; STARLING, J. J. Reversal of multidrug resistance by the P-glycoprotein modulator, LY335979, from the bench to the clinic. **Curr Med Chem**, 8, n. 1, p. 39-50, Jan 2001.
- DAVIES, G.; LOBANOVA, L.; DAWICKI, W.; GROOT, G. *et al.* Metformin inhibits the development, and promotes the resensitization, of treatment-resistant breast cancer. **PLoS One**, 12, n. 12, p. e0187191, 2017.
- DAVIES, K. J.; DOROSHOW, J. H. Redox cycling of anthracyclines by cardiac mitochondria. I. Anthracycline radical formation by NADH dehydrogenase. **J Biol Chem**, 261, n. 7, p. 3060-3067, Mar 5 1986.
- DAVIS, M. P.; PANIKKAR, R. Sarcopenia associated with chemotherapy and targeted agents for cancer therapy. **Ann Palliat Med**, 8, n. 1, p. 86-101, Jan 2019.
- DE BEER, E. L.; FINKLE, H.; VOEST, E. E.; VAN HEIJST, B. G. *et al.* Doxorubicin interacts directly with skinned single skeletal muscle fibres. **Eur J Pharmacol**, 214, n. 1, p. 97-100, Apr 07 1992.
- DE LIMA, E. A.; DE SOUSA, L. G. O.; DE, S. T. A. A.; MARSHALL, A. G. *et al.* Aerobic exercise, but not metformin, prevents reduction of muscular performance by AMPk activation in mice on doxorubicin chemotherapy. **J Cell Physiol**, 233, n. 12, p. 9652-9662, Dec 2018.
- DE LIMA JUNIOR, E. A.; YAMASHITA, A. S.; PIMENTEL, G. D.; DE SOUSA, L. G. *et al.* Doxorubicin caused severe hyperglycaemia and insulin resistance, mediated by inhibition in AMPk signalling in skeletal muscle. **J Cachexia Sarcopenia Muscle**, 7, n. 5, p. 615-625, Dec 2016.
- DE PALMA, M.; BIZIATO, D.; PETROVA, T. V. Microenvironmental regulation of tumour angiogenesis. **Nat Rev Cancer**, 17, n. 8, p. 457-474, Aug 2017.

DEAVALL, D. G.; MARTIN, E. A.; HORNER, J. M.; ROBERTS, R. Drug-induced oxidative stress and toxicity. **J Toxicol**, 2012, p. 645460, 2012.

DEVITA, V. T., Jr.; CHU, E. A history of cancer chemotherapy. **Cancer Res**, 68, n. 21, p. 8643-8653, Nov 1 2008.

DICKINSON, J. M.; D'LUGOS, A. C.; MAHMOOD, T. N.; ORMSBY, J. C. *et al.* Exercise Protects Skeletal Muscle during Chronic Doxorubicin Administration. **Med Sci Sports Exerc**, Jul 31 2017.

DIKIC, I.; ELAZAR, Z. Mechanism and medical implications of mammalian autophagy. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 19, n. 6, p. 349-364, Jun 2018.

DOWLING, R. J.; GOODWIN, P. J.; STAMBOLIC, V. Understanding the benefit of metformin use in cancer treatment. **BMC Med**, 9, p. 33, Apr 6 2011.

DUYNDAM, M. C.; VAN BERKEL, M. P.; DORSMAN, J. C.; ROCKX, D. A. *et al.* Cisplatin and doxorubicin repress Vascular Endothelial Growth Factor expression and differentially down-regulate Hypoxia-inducible Factor 1 activity in human ovarian cancer cells. **Biochem Pharmacol**, 74, n. 2, p. 191-201, Jul 15 2007.

EL-ASHMAWY, N. E.; KHEDR, N. F.; EL-BAHRAWY, H. A.; ABO MANSOUR, H. E. Metformin augments doxorubicin cytotoxicity in mammary carcinoma through activation of adenosine monophosphate protein kinase pathway. **Tumour Biol**, 39, n. 5, p. 1010428317692235, May 2017.

EL-FATATRY, B. M.; IBRAHIM, O. M.; HUSSIEN, F. Z.; MOSTAFA, T. M. Role of metformin in oxaliplatin-induced peripheral neuropathy in patients with stage III colorectal cancer: randomized, controlled study. **Int J Colorectal Dis**, 33, n. 12, p. 1675-1683, Dec 2018.

ERTUNC, M.; SARA, Y.; KORKUSUZ, P.; ONUR, R. Differential contractile impairment of fast- and slow-twitch skeletal muscles in a rat model of doxorubicin-induced congestive heart failure. **Pharmacology**, 84, n. 4, p. 240-248, 2009.

ESCHKE, R. K.; LAMPIT, A.; SCHENK, A.; JAVELLE, F. *et al.* Impact of Physical Exercise on Growth and Progression of Cancer in Rodents-A Systematic Review and Meta-Analysis. **Front Oncol**, 9, p. 35, 2019.

EWER, M. S.; VON HOFF, D. D.; BENJAMIN, R. S. A historical perspective of anthracycline cardiotoxicity. **Heart Fail Clin**, 7, n. 3, p. 363-372, Jul 2011.

FABRIS, S.; MACLEAN, D. A. Skeletal Muscle an Active Compartment in the Sequestering and Metabolism of Doxorubicin Chemotherapy. **PLoS One**, 10, n. 9, p. e0139070, 2015.

FAHIM, M. A.; KATAYA, H.; EL-KHARRAG, R.; AMER, D. A. *et al.* Ghrelin attenuates gastrointestinal epithelial damage induced by doxorubicin. **World J Gastroenterol**, 17, n. 33, p. 3836-3841, Sep 7 2011.

FANG, J.; NAKAMURA, H.; IYER, A. K. Tumor-targeted induction of oxystress for cancer therapy. **J Drug Target**, 15, n. 7-8, p. 475-486, Aug-Sep 2007.

FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; DIKSHIT, R.; ESER, S. *et al.* Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **Int J Cancer**, 136, n. 5, p. E359-386, Mar 01 2015.

FOLMER, Y.; SCHNEIDER, M.; BLUM, H. E.; HAFKEMEYER, P. Reversal of drug resistance of hepatocellular carcinoma cells by adenoviral delivery of anti-ABCC2 antisense constructs. **Cancer Gene Ther**, 14, n. 11, p. 875-884, Nov 2007.

FOUAD, Y. A.; AANEI, C. Revisiting the hallmarks of cancer. **Am J Cancer Res**, 7, n. 5, p. 1016-1036, 2017.

GARCIA, J. M.; CATA, J. P.; DOUGHERTY, P. M.; SMITH, R. G. Ghrelin prevents cisplatin-induced mechanical hyperalgesia and cachexia. **Endocrinology**, 149, n. 2, p. 455-460, Feb 2008.

GIGLI, M.; RASOANAIVO, T. W.; MILLOT, J. M.; JEANNESSON, P. *et al.* Correlation between growth inhibition and intranuclear doxorubicin and 4'-deoxy-4'-iododoxorubicin quantitated in living K562 cells by microspectrofluorometry. **Cancer Res**, 49, n. 3, p. 560-564, Feb 1 1989.

GILDA, J. E.; GOMES, A. V. Stain-Free total protein staining is a superior loading control to beta-actin for Western blots. **Anal Biochem**, 440, n. 2, p. 186-188, Sep 15 2013.

GILLIAM, L. A.; LARK, D. S.; REESE, L. R.; TORRES, M. J. *et al.* Targeted overexpression of mitochondrial catalase protects against cancer chemotherapy-induced skeletal muscle dysfunction. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, 311, n. 2, p. E293-301, Aug 01 2016.

GILLIAM, L. A.; MOYLAN, J. S.; CALLAHAN, L. A.; SUMANDEA, M. P. *et al.* Doxorubicin causes diaphragm weakness in murine models of cancer chemotherapy. **Muscle Nerve**, 43, n. 1, p. 94-102, Jan 2011.

GILLIAM, L. A.; MOYLAN, J. S.; PATTERSON, E. W.; SMITH, J. D. *et al.* Doxorubicin acts via mitochondrial ROS to stimulate catabolism in C2C12 myotubes. **Am J Physiol Cell Physiol**, 302, n. 1, p. C195-202, Jan 01 2012.

GILLIAM, L. A.; ST CLAIR, D. K. Chemotherapy-induced weakness and fatigue in skeletal muscle: the role of oxidative stress. **Antioxid Redox Signal**, 15, n. 9, p. 2543-2563, Nov 01 2011.

GILLIAM, L. A. A.; FISHER-WELLMAN, K. H.; LIN, C. T.; MAPLES, J. M. *et al.* The anticancer agent doxorubicin disrupts mitochondrial energy metabolism and redox balance in skeletal muscle. **Free Radic Biol Med**, 65, p. 988-996, Dec 2013.

- GILSON, H.; SCHAKMAN, O.; COMBARET, L.; LAUSE, P. *et al.* Myostatin gene deletion prevents glucocorticoid-induced muscle atrophy. **Endocrinology**, 148, n. 1, p. 452-460, Jan 2007.
- GLASS, D. J. Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. **Int J Biochem Cell Biol**, 37, n. 10, p. 1974-1984, Oct 2005.
- GLICKMAN, M. H.; CIECHANOVER, A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. **Physiol Rev**, 82, n. 2, p. 373-428, Apr 2002.
- GODSLAND, I. F. Insulin resistance and hyperinsulinaemia in the development and progression of cancer. **Clin Sci (Lond)**, 118, n. 5, p. 315-332, Nov 23 2009.
- GOLL, D. E.; THOMPSON, V. F.; LI, H.; WEI, W. *et al.* The calpain system. **Physiol Rev**, 83, n. 3, p. 731-801, Jul 2003.
- GOMES, M.; TEIXEIRA, A. L.; COELHO, A.; ARAUJO, A. *et al.* The role of inflammation in lung cancer. **Adv Exp Med Biol**, 816, p. 1-23, 2014.
- GOMES, M. D.; LECKER, S. H.; JAGOE, R. T.; NAVON, A. *et al.* Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 98, n. 25, p. 14440-14445, Dec 4 2001.
- GOTTESMAN, M. M.; FOJO, T.; BATES, S. E. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. **Nat Rev Cancer**, 2, n. 1, p. 48-58, Jan 2002.
- GRAHAM, G. G.; PUNT, J.; ARORA, M.; DAY, R. O. *et al.* Clinical pharmacokinetics of metformin. **Clin Pharmacokinet**, 50, n. 2, p. 81-98, Feb 2011.
- GREENE, R. F.; COLLINS, J. M.; JENKINS, J. F.; SPEYER, J. L. *et al.* Plasma pharmacokinetics of adriamycin and adriamycinol: implications for the design of in vitro experiments and treatment protocols. **Cancer Res**, 43, n. 7, p. 3417-3421, Jul 1983.
- GUIGNI, B. A.; FIX, D. K.; BIVONA, J. J., 3rd; PALMER, B. M. *et al.* Electrical stimulation prevents doxorubicin-induced atrophy and mitochondrial loss in cultured myotubes. **Am J Physiol Cell Physiol**, 317, n. 6, p. C1213-C1228, Dec 1 2019.
- GUMUCIO, J. P.; MENDIAS, C. L. Atrogin-1, MuRF-1, and sarcopenia. **Endocrine**, 43, n. 1, p. 12-21, Feb 2013.
- HANAHAH, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, 144, n. 5, p. 646-674, Mar 4 2011.
- HEQUET, O.; LE, Q. H.; MOULLET, I.; PAULI, E. *et al.* Subclinical late cardiomyopathy after doxorubicin therapy for lymphoma in adults. **J Clin Oncol**, 22, n. 10, p. 1864-1871, May 15 2004.

- HERSHMAN, D. L.; MCBRIDE, R. B.; EISENBERGER, A.; TSAI, W. Y. *et al.* Doxorubicin, cardiac risk factors, and cardiac toxicity in elderly patients with diffuse B-cell non-Hodgkin's lymphoma. **J Clin Oncol**, 26, n. 19, p. 3159-3165, Jul 1 2008.
- HIENSCH, A. E.; BOLAM, K. A.; MIJWEL, S.; JENESON, J. A. L. *et al.* Doxorubicin-induced skeletal muscle atrophy: Elucidating the underlying molecular pathways. **Acta Physiol (Oxf)**, p. e13400, Oct 10 2019.
- HIGUCHI, R.; DOLLINGER, G.; WALSH, P. S.; GRIFFITH, R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. **Biotechnology (N Y)**, 10, n. 4, p. 413-417, Apr 1992.
- HITTEL, D. S.; AXELSON, M.; SARNA, N.; SHEARER, J. *et al.* Myostatin decreases with aerobic exercise and associates with insulin resistance. **Med Sci Sports Exerc**, 42, n. 11, p. 2023-2029, Nov 2010.
- HOJMAN, P.; DETHLEFSEN, C.; BRANDT, C.; HANSEN, J. *et al.* Exercise-induced muscle-derived cytokines inhibit mammary cancer cell growth. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, 301, n. 3, p. E504-510, Sep 2011.
- HOJMAN, P.; GEHL, J.; CHRISTENSEN, J. F.; PEDERSEN, B. K. Molecular Mechanisms Linking Exercise to Cancer Prevention and Treatment. **Cell Metab**, 27, n. 1, p. 10-21, Jan 9 2018.
- HOLMAN, R. R.; PAUL, S. K.; BETHEL, M. A.; MATTHEWS, D. R. *et al.* 10-year follow-up of intensive glucose control in type 2 diabetes. **N Engl J Med**, 359, n. 15, p. 1577-1589, Oct 9 2008.
- HORTOBAGYI, G. N. Anthracyclines in the treatment of cancer. An overview. **Drugs**, 54 Suppl 4, p. 1-7, 1997.
- HUERTAS, A. M.; MORTON, A. B.; HINKEY, J. M.; ICHINOSEKI-SEKINE, N. *et al.* Modification of Neuromuscular Junction Protein Expression by Exercise and Doxorubicin. **Med Sci Sports Exerc**, Jan 24 2020.
- HULMI, J. J.; NISSINEN, T. A.; RASANEN, M.; DEGERMAN, J. *et al.* Prevention of chemotherapy-induced cachexia by ACVR2B ligand blocking has different effects on heart and skeletal muscle. **J Cachexia Sarcopenia Muscle**, 9, n. 2, p. 417-432, Apr 2018.
- HYDOCK, D. S.; LIEN, C. Y.; JENSEN, B. T.; SCHNEIDER, C. M. *et al.* Characterization of the effect of in vivo doxorubicin treatment on skeletal muscle function in the rat. **Anticancer Res**, 31, n. 6, p. 2023-2028, Jun 2011.
- ILIOPOULOS, D.; HIRSCH, H. A.; STRUHL, K. Metformin decreases the dose of chemotherapy for prolonging tumor remission in mouse xenografts involving multiple cancer cell types. **Cancer Res**, 71, n. 9, p. 3196-3201, May 01 2011.

ILIOPOULOS, D.; HIRSCH, H. A.; WANG, G.; STRUHL, K. Inducible formation of breast cancer stem cells and their dynamic equilibrium with non-stem cancer cells via IL6 secretion. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 108, n. 4, p. 1397-1402, Jan 25 2011.

INCA. Estimativa 2020 : incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Rio de Janeiro, RJ: Instituto Nacional de Câncer 2019.

ITO, A.; LAI, C. H.; ZHAO, X.; SAITO, S. *et al.* p300/CBP-mediated p53 acetylation is commonly induced by p53-activating agents and inhibited by MDM2. **EMBO J**, 20, n. 6, p. 1331-1340, Mar 15 2001.

JACKMAN, R. W.; KANDARIAN, S. C. The molecular basis of skeletal muscle atrophy. **Am J Physiol Cell Physiol**, 287, n. 4, p. C834-843, Oct 2004.

JIANG, P.; MIZUSHIMA, N. Autophagy and human diseases. **Cell Res**, 24, n. 1, p. 69-79, Jan 2014.

JOHNSON, A.; DEMMELMAIER, I.; SJOVALL, K.; WAGNER, P. *et al.* A single exercise session improves side-effects of chemotherapy in women with breast cancer: an observational study. **BMC Cancer**, 19, n. 1, p. 1073, Nov 8 2019.

JONES, L. W.; ANTONELLI, J.; MASKO, E. M.; BROADWATER, G. *et al.* Exercise modulation of the host-tumor interaction in an orthotopic model of murine prostate cancer. **J Appl Physiol (1985)**, 113, n. 2, p. 263-272, Jul 2012.

JONES, L. W.; EVES, N. D.; COURNEYA, K. S.; CHIU, B. K. *et al.* Effects of exercise training on antitumor efficacy of doxorubicin in MDA-MB-231 breast cancer xenografts. **Clin Cancer Res**, 11, n. 18, p. 6695-6698, Sep 15 2005.

JONES, L. W.; FELLS, D. R.; WEST, M.; ALLEN, J. D. *et al.* Modulation of circulating angiogenic factors and tumor biology by aerobic training in breast cancer patients receiving neoadjuvant chemotherapy. **Cancer Prev Res (Phila)**, 6, n. 9, p. 925-937, Sep 2013.

JONES, L. W.; VIGLIANTI, B. L.; TASHJIAN, J. A.; KOTHADIA, S. M. *et al.* Effect of aerobic exercise on tumor physiology in an animal model of human breast cancer. **J Appl Physiol (1985)**, 108, n. 2, p. 343-348, Feb 2010.

JUDGE, S. M.; WU, C. L.; BEHARRY, A. W.; ROBERTS, B. M. *et al.* Genome-wide identification of FoxO-dependent gene networks in skeletal muscle during C26 cancer cachexia. **BMC Cancer**, 14, p. 997, Dec 24 2014.

JUNG, H. W.; KIM, J. W.; KIM, J. Y.; KIM, S. W. *et al.* Effect of muscle mass on toxicity and survival in patients with colon cancer undergoing adjuvant chemotherapy. **Support Care Cancer**, 23, n. 3, p. 687-694, Mar 2015.

KASZNICKI, J.; SLIWINSKA, A.; DRZEWOSKI, J. Metformin in cancer prevention and therapy. **Ann Transl Med**, 2, n. 6, p. 57, Jun 2014.

KAVAZIS, A. N.; SMUDER, A. J.; POWERS, S. K. Effects of short-term endurance exercise training on acute doxorubicin-induced FoxO transcription in cardiac and skeletal muscle. **J Appl Physiol** (1985), 117, n. 3, p. 223-230, Aug 01 2014.

KESSELS, E.; HUSSON, O.; VAN DER FELTZ-CORNELIS, C. M. The effect of exercise on cancer-related fatigue in cancer survivors: a systematic review and meta-analysis. **Neuropsychiatr Dis Treat**, 14, p. 479-494, 2018.

KHEIRANDISH, M.; MAHBOOBI, H.; YAZDANPARAST, M.; KAMAL, W. *et al.* Anti-cancer Effects of Metformin: Recent Evidences for its Role in Prevention and Treatment of Cancer. **Curr Drug Metab**, 19, n. 9, p. 793-797, 2018.

KHOO, B. L.; GRENCI, G.; LIM, J. S. Y.; LIM, Y. P. *et al.* Low-dose anti-inflammatory combinatorial therapy reduced cancer stem cell formation in patient-derived preclinical models for tumour relapse prevention. **Br J Cancer**, 120, n. 4, p. 407-423, Feb 2019.

KIM, D. W.; HUAMANI, J.; NIERMANN, K. J.; LEE, H. *et al.* Noninvasive assessment of tumor vasculature response to radiation-mediated, vasculature-targeted therapy using quantified power Doppler sonography: implications for improvement of therapy schedules. **J Ultrasound Med**, 25, n. 12, p. 1507-1517, Dec 2006.

KIM, J. A.; CHO, K. B.; KIM, M. R.; PARK, B. C. *et al.* Decreased production of vascular endothelial growth factor in adriamycin-resistant breast cancer cells. **Cancer Lett**, 268, n. 2, p. 225-232, Sep 18 2008.

KOH, M. Y.; LEMOS, R., Jr.; LIU, X.; POWIS, G. The hypoxia-associated factor switches cells from HIF-1alpha- to HIF-2alpha-dependent signaling promoting stem cell characteristics, aggressive tumor growth and invasion. **Cancer Res**, 71, n. 11, p. 4015-4027, Jun 1 2011.

KUMAR, N.; CRAMER, G. M.; DAHAJ, S. A. Z.; SUNDARAM, B. *et al.* Stochastic modeling of phenotypic switching and chemoresistance in cancer cell populations. **Sci Rep**, 9, n. 1, p. 10845, Jul 26 2019.

KUMARI, N.; DWARAKANATH, B. S.; DAS, A.; BHATT, A. N. Role of interleukin-6 in cancer progression and therapeutic resistance. **Tumour Biol**, 37, n. 9, p. 11553-11572, Sep 2016.

KURELAC, I.; UMESH GANESH, N.; IORIO, M.; PORCELLI, A. M. *et al.* The multifaceted effects of metformin on tumor microenvironment. **Semin Cell Dev Biol**, 98, p. 90-97, Feb 2020.

KWATRA, M.; JANGRA, A.; MISHRA, M.; SHARMA, Y. *et al.* Naringin and Sertraline Ameliorate Doxorubicin-Induced Behavioral Deficits Through Modulation of Serotonin Level and Mitochondrial Complexes Protection Pathway in Rat Hippocampus. **Neurochem Res**, 41, n. 9, p. 2352-2366, Sep 2016.

LAL, S.; MAHAJAN, A.; CHEN, W. N.; CHOWBAY, B. Pharmacogenetics of target genes across doxorubicin disposition pathway: a review. **Curr Drug Metab**, 11, n. 1, p. 115-128, Jan 2010.

LAL, S.; WONG, Z. W.; JADA, S. R.; XIANG, X. *et al.* Novel SLC22A16 polymorphisms and influence on doxorubicin pharmacokinetics in Asian breast cancer patients. **Pharmacogenomics**, 8, n. 6, p. 567-575, Jun 2007.

LANDMAN, G. W.; KLEEFSTRA, N.; VAN HATEREN, K. J.; GROENIER, K. H. *et al.* Metformin associated with lower cancer mortality in type 2 diabetes: ZODIAC-16. **Diabetes Care**, 33, n. 2, p. 322-326, Feb 2010.

LATHIA, J. D.; LIU, H. Overview of Cancer Stem Cells and Stemness for Community Oncologists. **Target Oncol**, 12, n. 4, p. 387-399, Aug 2017.

LEE, K.; QIAN, D. Z.; REY, S.; WEI, H. *et al.* Anthracycline chemotherapy inhibits HIF-1 transcriptional activity and tumor-induced mobilization of circulating angiogenic cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 106, n. 7, p. 2353-2358, Feb 17 2009.

LEE, S. J.; MCPHERRON, A. C. Regulation of myostatin activity and muscle growth. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 98, n. 16, p. 9306-9311, Jul 31 2001.

LEE, Y.; KWON, I.; JANG, Y.; COSIO-LIMA, L. *et al.* Endurance Exercise Attenuates Doxorubicin-induced Cardiotoxicity. **Med Sci Sports Exerc**, 52, n. 1, p. 25-36, Jan 2020.

LESSARD, S. J.; MACDONALD, T. L.; PATHAK, P.; HAN, M. S. *et al.* JNK regulates muscle remodeling via myostatin/SMAD inhibition. **Nat Commun**, 9, n. 1, p. 3030, Aug 2 2018.

LEUNG, P. S.; ARONSON, W. J.; NGO, T. H.; GOLDING, L. A. *et al.* Exercise alters the IGF axis in vivo and increases p53 protein in prostate tumor cells in vitro. **J Appl Physiol (1985)**, 96, n. 2, p. 450-454, Feb 2004.

LI, H.; MALHOTRA, S.; KUMAR, A. Nuclear factor-kappa B signaling in skeletal muscle atrophy. **J Mol Med (Berl)**, 86, n. 10, p. 1113-1126, Oct 2008.

LI, J.; GUI, Y.; REN, J.; LIU, X. *et al.* Metformin Protects Against Cisplatin-Induced Tubular Cell Apoptosis and Acute Kidney Injury via AMPKalpha-regulated Autophagy Induction. **Sci Rep**, 6, p. 23975, Apr 7 2016.

LI, S.; YUAN, S.; ZHAO, Q.; WANG, B. *et al.* Quercetin enhances chemotherapeutic effect of doxorubicin against human breast cancer cells while reducing toxic side effects of it. **Biomed Pharmacother**, 100, p. 441-447, Apr 2018.

LI, W.; ZHANG, X.; SANG, H.; ZHOU, Y. *et al.* Effects of hyperglycemia on the progression of tumor diseases. **J Exp Clin Cancer Res**, 38, n. 1, p. 327, Jul 23 2019.

LI, Y.; WANG, M.; ZHI, P.; YOU, J. *et al.* Metformin synergistically suppress tumor growth with doxorubicin and reverse drug resistance by inhibiting the expression and function of P-glycoprotein in MCF7/ADR cells and xenograft models. **Oncotarget**, 9, n. 2, p. 2158-2174, Jan 5 2018.

LIPSHULTZ, S. E.; COLAN, S. D.; GELBER, R. D.; PEREZ-ATAYDE, A. R. *et al.* Late cardiac effects of doxorubicin therapy for acute lymphoblastic leukemia in childhood. **N Engl J Med**, 324, n. 12, p. 808-815, Mar 21 1991.

LIPSHULTZ, S. E.; LIPSITZ, S. R.; SALLAN, S. E.; DALTON, V. M. *et al.* Chronic progressive cardiac dysfunction years after doxorubicin therapy for childhood acute lymphoblastic leukemia. **J Clin Oncol**, 23, n. 12, p. 2629-2636, Apr 20 2005.

LIPSHULTZ, S. E.; MILLER, T. L.; SCULLY, R. E.; LIPSITZ, S. R. *et al.* Changes in cardiac biomarkers during doxorubicin treatment of pediatric patients with high-risk acute lymphoblastic leukemia: associations with long-term echocardiographic outcomes. **J Clin Oncol**, 30, n. 10, p. 1042-1049, Apr 1 2012.

LIPSHULTZ, S. E.; SCULLY, R. E.; LIPSITZ, S. R.; SALLAN, S. E. *et al.* Assessment of dexrazoxane as a cardioprotectant in doxorubicin-treated children with high-risk acute lymphoblastic leukaemia: long-term follow-up of a prospective, randomised, multicentre trial. **Lancet Oncol**, 11, n. 10, p. 950-961, Oct 2010.

LIU, C. C.; LIN, J. H.; HSU, T. W.; SU, K. *et al.* IL-6 enriched lung cancer stem-like cell population by inhibition of cell cycle regulators via DNMT1 upregulation. **Int J Cancer**, 136, n. 3, p. 547-559, Feb 1 2015.

LIU, D.; QIAO, X.; GE, Z.; SHANG, Y. *et al.* IMB0901 inhibits muscle atrophy induced by cancer cachexia through MSTN signaling pathway. **Skelet Muscle**, 9, n. 1, p. 8, Mar 28 2019.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. **Methods**, 25, n. 4, p. 402-408, Dec 2001.

LOPES, M. A.; MEISEL, A.; DIRNAGL, U.; CARVALHO, F. D. *et al.* Doxorubicin induces biphasic neurotoxicity to rat cortical neurons. **Neurotoxicology**, 29, n. 2, p. 286-293, Mar 2008.

LOUIS, E.; RAUE, U.; YANG, Y.; JEMIOLO, B. *et al.* Time course of proteolytic, cytokine, and myostatin gene expression after acute exercise in human skeletal muscle. **J Appl Physiol (1985)**, 103, n. 5, p. 1744-1751, Nov 2007.

MA, K.; MALLIDIS, C.; BHASIN, S.; MAHABADI, V. *et al.* Glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy is associated with upregulation of myostatin gene expression. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, 285, n. 2, p. E363-371, Aug 2003.

MAO-YING, Q. L.; KAVELAARS, A.; KRUKOWSKI, K.; HUO, X. J. *et al.* The anti-diabetic drug metformin protects against chemotherapy-induced peripheral neuropathy in a mouse model. **PLoS One**, 9, n. 6, p. e100701, 2014.

MARKS, D. L.; OLSON, R. L.; FERNANDEZ-ZAPICO, M. E. Epigenetic control of the tumor microenvironment. **Epigenomics**, 8, n. 12, p. 1671-1687, Dec 2016.

MCCULLOUGH, D. J.; STABLEY, J. N.; SIEMANN, D. W.; BEHNKE, B. J. Modulation of blood flow, hypoxia, and vascular function in orthotopic prostate tumors during exercise. **J Natl Cancer Inst**, 106, n. 4, p. dju036, Apr 2014.

MCFARLANE, C.; PLUMMER, E.; THOMAS, M.; HENNEBRY, A. *et al.* Myostatin induces cachexia by activating the ubiquitin proteolytic system through an NF-kappaB-independent, FoxO1-dependent mechanism. **J Cell Physiol**, 209, n. 2, p. 501-514, Nov 2006.

MENESES-ECHAVEZ, J. F.; GONZALEZ-JIMENEZ, E.; RAMIREZ-VELEZ, R. Supervised exercise reduces cancer-related fatigue: a systematic review. **J Physiother**, 61, n. 1, p. 3-9, Jan 2015.

MILAN, G.; ROMANELLO, V.; PESCATORE, F.; ARMANI, A. *et al.* Regulation of autophagy and the ubiquitin-proteasome system by the FoxO transcriptional network during muscle atrophy. **Nat Commun**, 6, p. 6670, Apr 10 2015.

MILLER, A.; MCLEOD, L.; ALHAYYANI, S.; SZCZEPNY, A. *et al.* Blockade of the IL-6 trans-signalling/STAT3 axis suppresses cachexia in Kras-induced lung adenocarcinoma. **Oncogene**, 36, n. 21, p. 3059-3066, May 25 2017.

MILLER, K. D.; NOGUEIRA, L.; MARIOTTO, A. B.; ROWLAND, J. H. *et al.* Cancer treatment and survivorship statistics, 2019. **CA Cancer J Clin**, 69, n. 5, p. 363-385, Sep 2019.

MIN, K.; KWON, O. S.; SMUDER, A. J.; WIGGS, M. P. *et al.* Increased mitochondrial emission of reactive oxygen species and calpain activation are required for doxorubicin-induced cardiac and skeletal muscle myopathy. **J Physiol**, 593, n. 8, p. 2017-2036, Apr 15 2015.

MINOTTI, G.; MENNA, P.; SALVATORELLI, E.; CAIRO, G. *et al.* Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. **Pharmacol Rev**, 56, n. 2, p. 185-229, Jun 2004.

MIRA, E.; CARMONA-RODRIGUEZ, L.; PEREZ-VILLAMIL, B.; CASAS, J. *et al.* SOD3 improves the tumor response to chemotherapy by stabilizing endothelial HIF-2alpha. **Nat Commun**, 9, n. 1, p. 575, Feb 8 2018.

MITRY, M. A.; LAURENT, D.; KEITH, B. L.; SIRA, E. *et al.* Accelerated cardiomyocyte senescence contributes to late-onset doxorubicin-induced cardiotoxicity. **Am J Physiol Cell Physiol**, 318, n. 2, p. C380-C391, Feb 1 2020.

MIYAMOTO, Y.; BABA, Y.; SAKAMOTO, Y.; OHUCHI, M. *et al.* Sarcopenia is a Negative Prognostic Factor After Curative Resection of Colorectal Cancer. **Ann Surg Oncol**, 22, n. 8, p. 2663-2668, Aug 2015.

- MONTALVO, R. N.; DOERR, V.; MIN, K.; SZETO, H. H. *et al.* Doxorubicin-induced oxidative stress differentially regulates proteolytic signaling in cardiac and skeletal muscle. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, 318, n. 2, p. R227-R233, Feb 1 2020.
- MORALES, A. I.; DETAILLE, D.; PRIETO, M.; PUENTE, A. *et al.* Metformin prevents experimental gentamicin-induced nephropathy by a mitochondria-dependent pathway. **Kidney Int**, 77, n. 10, p. 861-869, May 2010.
- MORO, M.; CAIOLA, E.; GANZINELLI, M.; ZULATO, E. *et al.* Metformin Enhances Cisplatin-Induced Apoptosis and Prevents Resistance to Cisplatin in Co-mutated KRAS/LKB1 NSCLC. **J Thorac Oncol**, 13, n. 11, p. 1692-1704, Nov 2018.
- MORRELL, M. B. G.; ALVAREZ-FLOREZ, C.; ZHANG, A.; KLEINERMAN, E. S. *et al.* Vascular modulation through exercise improves chemotherapy efficacy in Ewing sarcoma. **Pediatr Blood Cancer**, 66, n. 9, p. e27835, Sep 2019.
- MURPHY, E. A.; ENOS, R. T.; VELAZQUEZ, K. T. Influence of Exercise on Inflammation in Cancer: Direct Effect or Innocent Bystander? **Exerc Sport Sci Rev**, 43, n. 3, p. 134-142, Jul 2015.
- NAGATA, J.; KIJIMA, H.; HATANAKA, H.; ASAI, S. *et al.* Reversal of drug resistance using hammerhead ribozymes against multidrug resistance-associated protein and multidrug resistance 1 gene. **Int J Oncol**, 21, n. 5, p. 1021-1026, Nov 2002.
- NARSALE, A. A.; CARSON, J. A. Role of interleukin-6 in cachexia: therapeutic implications. **Curr Opin Support Palliat Care**, 8, n. 4, p. 321-327, Dec 2014.
- NEEL, B. A.; LIN, Y.; PESSIN, J. E. Skeletal muscle autophagy: a new metabolic regulator. **Trends Endocrinol Metab**, 24, n. 12, p. 635-643, Dec 2013.
- NIH. What Is Cancer? p. <http://www.cancer.gov/about-cancer/what-is-cancer>. , 2015.
- NIRAULA, S.; DOWLING, R. J.; ENNIS, M.; CHANG, M. C. *et al.* Metformin in early breast cancer: a prospective window of opportunity neoadjuvant study. **Breast Cancer Res Treat**, 135, n. 3, p. 821-830, Oct 2012.
- NISSINEN, T. A.; DEGERMAN, J.; RASANEN, M.; POIKONEN, A. R. *et al.* Systemic blockade of ACVR2B ligands prevents chemotherapy-induced muscle wasting by restoring muscle protein synthesis without affecting oxidative capacity or atrogenes. **Sci Rep**, 6, p. 32695, Sep 26 2016.
- NORTHCOTT, J. M.; NORTHEY, J. J.; BARNES, J. M.; WEAVER, V. M. Fighting the force: Potential of homeobox genes for tumor microenvironment regulation. **Biochim Biophys Acta**, 1855, n. 2, p. 248-253, Apr 2015.
- NUSRAT, O.; BELOTTE, J.; FLETCHER, N. M.; MEMAJ, I. *et al.* The Role of Angiogenesis in the Persistence of Chemoresistance in Epithelial Ovarian Cancer. **Reprod Sci**, 23, n. 11, p. 1484-1492, Nov 2016.

- O'NEILL, B. T.; BHARDWAJ, G.; PENNIMAN, C. M.; KRUMPOCH, M. T. *et al.* FoxO Transcription Factors Are Critical Regulators of Diabetes-Related Muscle Atrophy. **Diabetes**, 68, n. 3, p. 556-570, Mar 2019.
- O'REGAN, P.; MCCARTHY, G.; O'REILLY, S.; POWER, D. *et al.* Cancer-related fatigue and self-care agency: A multicentre survey of patients receiving chemotherapy. **J Clin Nurs**, 28, n. 23-24, p. 4424-4433, Dec 2019.
- OAKHILL, J. S.; STEEL, R.; CHEN, Z. P.; SCOTT, J. W. *et al.* AMPK is a direct adenylate charge-regulated protein kinase. **Science**, 332, n. 6036, p. 1433-1435, Jun 17 2011.
- OHE, Y.; PODACK, E. R.; OLSEN, K. J.; MIYAHARA, Y. *et al.* Interleukin-6 cDNA transfected Lewis lung carcinoma cells show unaltered net tumour growth rate but cause weight loss and shortened survival in syngeneic mice. **Br J Cancer**, 67, n. 5, p. 939-944, May 1993.
- PARRY, T. L.; HAYWARD, R. Exercise training does not affect anthracycline antitumor efficacy while attenuating cardiac dysfunction. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, 309, n. 6, p. R675-683, Sep 15 2015.
- PEDERSEN, B. K. Exercise-induced myokines and their role in chronic diseases. **Brain Behav Immun**, 25, n. 5, p. 811-816, Jul 2011a.
- PEDERSEN, B. K. Muscles and their myokines. **J Exp Biol**, 214, n. Pt 2, p. 337-346, Jan 15 2011b.
- PEDERSEN, L.; IDORN, M.; OLOFSSON, G. H.; LAUENBORG, B. *et al.* Voluntary Running Suppresses Tumor Growth through Epinephrine- and IL-6-Dependent NK Cell Mobilization and Redistribution. **Cell Metab**, 23, n. 3, p. 554-562, Mar 8 2016.
- PEREGO, P.; CORNA, E.; DE CESARE, M.; GATTI, L. *et al.* Role of apoptosis and apoptosis-related genes in cellular response and antitumor efficacy of anthracyclines. **Curr Med Chem**, 8, n. 1, p. 31-37, Jan 2001.
- PERNICOVA, I.; KORBONITS, M. Metformin--mode of action and clinical implications for diabetes and cancer. **Nat Rev Endocrinol**, 10, n. 3, p. 143-156, Mar 2014.
- PETERSEN, A. M.; PEDERSEN, B. K. The anti-inflammatory effect of exercise. **J Appl Physiol (1985)**, 98, n. 4, p. 1154-1162, Apr 2005.
- PETROVA, V.; ANNICCHIARICO-PETRUZZELLI, M.; MELINO, G.; AMELIO, I. The hypoxic tumour microenvironment. **Oncogenesis**, 7, n. 1, p. 10, Jan 24 2018.
- PHI, L. T. H.; SARI, I. N.; YANG, Y. G.; LEE, S. H. *et al.* Cancer Stem Cells (CSCs) in Drug Resistance and their Therapeutic Implications in Cancer Treatment. **Stem Cells Int**, 2018, p. 5416923, 2018.

PIN, F.; COUCH, M. E.; BONETTO, A. Preservation of muscle mass as a strategy to reduce the toxic effects of cancer chemotherapy on body composition. **Curr Opin Support Palliat Care**, 12, n. 4, p. 420-426, Dec 2018.

PORPORATO, P. E. Understanding cachexia as a cancer metabolism syndrome. **Oncogenesis**, 5, p. e200, Feb 22 2016.

POWERS, S. K.; DUARTE, J. A.; LE NGUYEN, B.; HYATT, H. Endurance exercise protects skeletal muscle against both doxorubicin-induced and inactivity-induced muscle wasting. **Pflugers Arch**, 471, n. 3, p. 441-453, Mar 2019.

PREZIOSI, P.; VACCA, M.; RAGAZZONI, E.; DEL CARMINE, R. *et al.* Stress hormone changes after toxic doses of new anticancer drugs. **Arch Toxicol Suppl**, 13, p. 436-439, 1989.

PUETZ, T. W.; HERRING, M. P. Differential effects of exercise on cancer-related fatigue during and following treatment: a meta-analysis. **Am J Prev Med**, 43, n. 2, p. e1-24, Aug 2012.

PUGAZHENDHI, A.; EDISON, T.; VELMURUGAN, B. K.; JACOB, J. A. *et al.* Toxicity of Doxorubicin (Dox) to different experimental organ systems. **Life Sci**, 200, p. 26-30, May 1 2018.

PUPPA, M. J.; GAO, S.; NARSALE, A. A.; CARSON, J. A. Skeletal muscle glycoprotein 130's role in Lewis lung carcinoma-induced cachexia. **FASEB J**, 28, n. 2, p. 998-1009, Feb 2014.

QIN, J.; DU, R.; YANG, Y. Q.; ZHANG, H. Q. *et al.* Dexamethasone-induced skeletal muscle atrophy was associated with upregulation of myostatin promoter activity. **Res Vet Sci**, 94, n. 1, p. 84-89, Feb 2013.

QU, C.; ZHANG, W.; ZHENG, G.; ZHANG, Z. *et al.* Metformin reverses multidrug resistance and epithelial-mesenchymal transition (EMT) via activating AMP-activated protein kinase (AMPK) in human breast cancer cells. **Mol Cell Biochem**, 386, n. 1-2, p. 63-71, Jan 2014.

RAGUZ, S.; YAGUE, E. Resistance to chemotherapy: new treatments and novel insights into an old problem. **Br J Cancer**, 99, n. 3, p. 387-391, Aug 5 2008.

RAHMAN, A.; CARMICHAEL, D.; HARRIS, M.; ROH, J. K. Comparative pharmacokinetics of free doxorubicin and doxorubicin entrapped in cardiolipin liposomes. **Cancer Res**, 46, n. 5, p. 2295-2299, May 1986.

REED, S. A.; SANDESARA, P. B.; SENF, S. M.; JUDGE, A. R. Inhibition of FoxO transcriptional activity prevents muscle fiber atrophy during cachexia and induces hypertrophy. **FASEB J**, 26, n. 3, p. 987-1000, Mar 2012.

REED, S. M.; QUELLE, D. E. p53 Acetylation: Regulation and Consequences. **Cancers (Basel)**, 7, n. 1, p. 30-69, Dec 23 2014.

RICHARDSON, D. S.; JOHNSON, S. A. Anthracyclines in haematology: preclinical studies, toxicity and delivery systems. **Blood Rev**, 11, n. 4, p. 201-223, Dec 1997.

RUGGERI, R. M.; SCIACCHITANO, S.; VITARELLI, E.; TRIMARCHI, F. *et al.* Immunoexpression of multidrug-resistance protein 2 and cyclooxygenase 2 in medullary thyroid carcinomas. **Arch Pathol Lab Med**, 130, n. 7, p. 1014-1019, Jul 2006.

RUIZ-CASADO, A.; MARTIN-RUIZ, A.; PEREZ, L. M.; PROVENCIO, M. *et al.* Exercise and the Hallmarks of Cancer. **Trends Cancer**, 3, n. 6, p. 423-441, Jun 2017.

RUNDQVIST, H.; AUGSTEN, M.; STROMBERG, A.; RULLMAN, E. *et al.* Effect of acute exercise on prostate cancer cell growth. **PLoS One**, 8, n. 7, p. e67579, 2013.

RYAN, A. M.; PRADO, C. M.; SULLIVAN, E. S.; POWER, D. G. *et al.* Effects of weight loss and sarcopenia on response to chemotherapy, quality of life, and survival. **Nutrition**, 67-68, p. 110539, Nov - Dec 2019.

SAKAGUCHI, K.; HERRERA, J. E.; SAITO, S.; MIKI, T. *et al.* DNA damage activates p53 through a phosphorylation-acetylation cascade. **Genes Dev**, 12, n. 18, p. 2831-2841, Sep 15 1998.

SALPETER, S. R.; BUCKLEY, N. S.; KAHN, J. A.; SALPETER, E. E. Meta-analysis: metformin treatment in persons at risk for diabetes mellitus. **Am J Med**, 121, n. 2, p. 149-157 e142, Feb 2008.

SANDRI, M. Protein breakdown in muscle wasting: role of autophagy-lysosome and ubiquitin-proteasome. **Int J Biochem Cell Biol**, 45, n. 10, p. 2121-2129, Oct 2013.

SANDRI, M.; SANDRI, C.; GILBERT, A.; SKURK, C. *et al.* Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. **Cell**, 117, n. 3, p. 399-412, Apr 30 2004.

SARAEI, P.; ASADI, I.; KAKAR, M. A.; MORADI-KOR, N. The beneficial effects of metformin on cancer prevention and therapy: a comprehensive review of recent advances. **Cancer Manag Res**, 11, p. 3295-3313, 2019.

SARTORI, R.; MILAN, G.; PATRON, M.; MAMMUCARI, C. *et al.* Smad2 and 3 transcription factors control muscle mass in adulthood. **Am J Physiol Cell Physiol**, 296, n. 6, p. C1248-1257, Jun 2009.

SAUTER, K. A.; WOOD, L. J.; WONG, J.; IORDANOV, M. *et al.* Doxorubicin and daunorubicin induce processing and release of interleukin-1beta through activation of the NLRP3 inflammasome. **Cancer Biol Ther**, 11, n. 12, p. 1008-1016, Jun 15 2011.

SCHADLER, K. L.; THOMAS, N. J.; GALIE, P. A.; BHANG, D. H. *et al.* Tumor vessel normalization after aerobic exercise enhances chemotherapeutic efficacy. **Oncotarget**, 7, n. 40, p. 65429-65440, Oct 4 2016.

SCHIAFFINO, S.; DYAR, K. A.; CICILIOT, S.; BLAAUW, B. *et al.* Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy. **FEBS J**, 280, n. 17, p. 4294-4314, Sep 2013.

SCHWARTZ, A. L. Daily fatigue patterns and effect of exercise in women with breast cancer. **Cancer Pract**, 8, n. 1, p. 16-24, Jan-Feb 2000.

SCHWARTZ, A. L.; MORI, M.; GAO, R.; NAIL, L. M. *et al.* Exercise reduces daily fatigue in women with breast cancer receiving chemotherapy. **Med Sci Sports Exerc**, 33, n. 5, p. 718-723, May 2001.

SCOTT, J. M.; KHAKOO, A.; MACKEY, J. R.; HAYKOWSKY, M. J. *et al.* Modulation of anthracycline-induced cardiotoxicity by aerobic exercise in breast cancer: current evidence and underlying mechanisms. **Circulation**, 124, n. 5, p. 642-650, Aug 2 2011.

SEN, G. S.; MOHANTY, S.; HOSSAIN, D. M.; BHATTACHARYYA, S. *et al.* Curcumin enhances the efficacy of chemotherapy by tailoring p65NFkappaB-p300 cross-talk in favor of p53-p300 in breast cancer. **J Biol Chem**, 286, n. 49, p. 42232-42247, Dec 9 2011.

SETTER, S. M.; ILTZ, J. L.; THAMS, J.; CAMPBELL, R. K. Metformin hydrochloride in the treatment of type 2 diabetes mellitus: a clinical review with a focus on dual therapy. **Clin Ther**, 25, n. 12, p. 2991-3026, Dec 2003.

SHALAMZARI, S. A.; AGHA-ALINEJAD, H.; ALIZADEH, S.; SHAHBAZI, S. *et al.* The effect of exercise training on the level of tissue IL-6 and vascular endothelial growth factor in breast cancer bearing mice. **Iran J Basic Med Sci**, 17, n. 4, p. 231-258, 2014.

SHAPIRO, A. L.; VINUELA, E.; MAIZEL, J. V., Jr. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. **Biochem Biophys Res Commun**, 28, n. 5, p. 815-820, Sep 7 1967.

SHAW, R. J.; LAMIA, K. A.; VASQUEZ, D.; KOO, S. H. *et al.* The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin. **Science**, 310, n. 5754, p. 1642-1646, Dec 9 2005.

SHEN, F.; CHU, S.; BENCE, A. K.; BAILEY, B. *et al.* Quantitation of doxorubicin uptake, efflux, and modulation of multidrug resistance (MDR) in MDR human cancer cells. **J Pharmacol Exp Ther**, 324, n. 1, p. 95-102, Jan 2008.

SHI, Y.; MOON, M.; DAWOOD, S.; MCMANUS, B. *et al.* Mechanisms and management of doxorubicin cardiotoxicity. **Herz**, 36, n. 4, p. 296-305, Jun 2011.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2018. **CA Cancer J Clin**, 68, n. 1, p. 7-30, Jan 2018.

SILVEIRA, L. S.; PIMENTEL, G. D.; SOUZA, C. O.; BIONDO, L. A. *et al.* Effect of an acute moderate-exercise session on metabolic and inflammatory profile of PPAR- α knockout mice. **Cell Biochem Funct**, 35, n. 8, p. 510-517, Dec 2017.

SIN, T. K.; TAM, B. T.; YU, A. P.; YIP, S. P. *et al.* Acute Treatment of Resveratrol Alleviates Doxorubicin-Induced Myotoxicity in Aged Skeletal Muscle Through SIRT1-Dependent Mechanisms. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, 71, n. 6, p. 730-739, Jun 2016.

SMITH, I. J.; ALAMDARI, N.; O'NEAL, P.; GONNELLA, P. *et al.* Sepsis increases the expression and activity of the transcription factor Forkhead Box O 1 (FOXO1) in skeletal muscle by a glucocorticoid-dependent mechanism. **Int J Biochem Cell Biol**, 42, n. 5, p. 701-711, May 2010.

SMUDER, A. J. Exercise stimulates beneficial adaptations to diminish doxorubicin-induced cellular toxicity. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, Aug 28 2019.

SMUDER, A. J.; KAVAZIS, A. N.; HUDSON, M. B.; NELSON, W. B. *et al.* Oxidation enhances myofibrillar protein degradation via calpain and caspase-3. **Free Radic Biol Med**, 49, n. 7, p. 1152-1160, Oct 15 2010.

SMUDER, A. J.; KAVAZIS, A. N.; MIN, K.; POWERS, S. K. Exercise protects against doxorubicin-induced markers of autophagy signaling in skeletal muscle. **J Appl Physiol (1985)**, 111, n. 4, p. 1190-1198, Oct 2011a.

SMUDER, A. J.; KAVAZIS, A. N.; MIN, K.; POWERS, S. K. Exercise protects against doxorubicin-induced oxidative stress and proteolysis in skeletal muscle. **J Appl Physiol (1985)**, 110, n. 4, p. 935-942, Apr 2011b.

SPEELMANS, G.; STAFFHORST, R. W.; DE KRUIJFF, B.; DE WOLF, F. A. Transport studies of doxorubicin in model membranes indicate a difference in passive diffusion across and binding at the outer and inner leaflets of the plasma membrane. **Biochemistry**, 33, n. 46, p. 13761-13768, Nov 22 1994.

SPETH, P. A.; VAN HOESEL, Q. G.; HAANEN, C. Clinical pharmacokinetics of doxorubicin. **Clin Pharmacokinet**, 15, n. 1, p. 15-31, Jul 1988.

STEINHERZ, L. J.; STEINHERZ, P. G.; TAN, C. T.; HELLER, G. *et al.* Cardiac toxicity 4 to 20 years after completing anthracycline therapy. **JAMA**, 266, n. 12, p. 1672-1677, Sep 25 1991.

STRASSMANN, G.; FONG, M.; KENNEY, J. S.; JACOB, C. O. Evidence for the involvement of interleukin 6 in experimental cancer cachexia. **J Clin Invest**, 89, n. 5, p. 1681-1684, May 1992.

STURGEON, K.; SCHADLER, K.; MUTHUKUMARAN, G.; DING, D. *et al.* Concomitant low-dose doxorubicin treatment and exercise. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, 307, n. 6, p. R685-692, Sep 15 2014.

SUPRIYA, R.; TAM, B. T.; PEI, X. M.; LAI, C. W. *et al.* Doxorubicin Induces Inflammatory Modulation and Metabolic Dysregulation in Diabetic Skeletal Muscle. **Front Physiol**, 7, p. 323, 2016.

TACAR, O.; SRIAMORNSAK, P.; DASS, C. R. Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. **J Pharm Pharmacol**, 65, n. 2, p. 157-170, Feb 2013.

TANG, Y.; ZHAO, W.; CHEN, Y.; ZHAO, Y. *et al.* Acetylation is indispensable for p53 activation. **Cell**, 133, n. 4, p. 612-626, May 16 2008.

TARPEY, M. D.; AMORESE, A. J.; BALESTRIERI, N. P.; FISHER-WELLMAN, K. H. *et al.* Doxorubicin causes lesions in the electron transport system of skeletal muscle mitochondria that are associated with a loss of contractile function. **J Biol Chem**, 294, n. 51, p. 19709-19722, Dec 20 2019.

TERASAKI, T.; IGA, T.; SUGIYAMA, Y.; SAWADA, Y. *et al.* Nuclear binding as a determinant of tissue distribution of adriamycin, daunomycin, adriamycinol, daunorubicinol and actinomycin D. **J Pharmacobiodyn**, 7, n. 5, p. 269-277, May 1984.

TEWEY, K. M.; ROWE, T. C.; YANG, L.; HALLIGAN, B. D. *et al.* Adriamycin-induced DNA damage mediated by mammalian DNA topoisomerase II. **Science**, 226, n. 4673, p. 466-468, Oct 26 1984.

THOMPSON, H. J.; WESTERLIND, K. C.; SNEDDEN, J.; BRIGGS, S. *et al.* Exercise intensity dependent inhibition of 1-methyl-1-nitrosourea induced mammary carcinogenesis in female F-344 rats. **Carcinogenesis**, 16, n. 8, p. 1783-1786, Aug 1995.

THORN, C. F.; OSHIRO, C.; MARSH, S.; HERNANDEZ-BOUSSARD, T. *et al.* Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. **Pharmacogenet Genomics**, 21, n. 7, p. 440-446, Jul 2011.

TIAN, L.; LU, H. J.; LIN, L.; HU, Y. Effects of aerobic exercise on cancer-related fatigue: a meta-analysis of randomized controlled trials. **Support Care Cancer**, 24, n. 2, p. 969-983, Feb 2016.

TOWBIN, H.; STAEHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 76, n. 9, p. 4350-4354, Sep 1979.

TAI, M. S.; CHANG, C. C.; KUO, M. L.; WU, Y. T. Vascular endothelial growth factor-A and changes in a tumor-bearing mouse model with Lewis lung cancer. **Oncol Lett**, 2, n. 6, p. 1143-1147, Nov 2011.

TAI, M. S.; KUO, M. L.; CHANG, C. C.; WU, Y. T. The effects of exercise training on levels of vascular endothelial growth factor in tumor-bearing mice. **Cancer Biomark**, 13, n. 5, p. 307-313, 2013.

UGWUEZE, C. V.; OGAMBA, O. J.; YOUNG, E. E.; ONYENEKWE, B. M. *et al.* Metformin: A Possible Option in Cancer Chemotherapy. **Anal Cell Pathol (Amst)**, 2020, p. 7180923, 2020.

VALLANCE, J. K.; COURNEYA, K. S.; PLOTNIKOFF, R. C.; YASUI, Y. *et al.* Randomized controlled trial of the effects of print materials and step pedometers on physical activity and quality of life in breast cancer survivors. **J Clin Oncol**, 25, n. 17, p. 2352-2359, Jun 10 2007.

VAN NEERVEN, S. M.; TIEKEN, M.; VERMEULEN, L.; BIJLSMA, M. F. Bidirectional interconversion of stem and non-stem cancer cell populations: A reassessment of theoretical models for tumor heterogeneity. **Mol Cell Oncol**, 3, n. 2, p. e1098791, Mar 2016.

VAN NORREN, K.; VAN HELVOORT, A.; ARGILES, J. M.; VAN TUIJL, S. *et al.* Direct effects of doxorubicin on skeletal muscle contribute to fatigue. **Br J Cancer**, 100, n. 2, p. 311-314, Jan 27 2009.

VIDAL, S. J.; RODRIGUEZ-BRAVO, V.; GALSKY, M.; CORDON-CARDO, C. *et al.* Targeting cancer stem cells to suppress acquired chemotherapy resistance. **Oncogene**, 33, n. 36, p. 4451-4463, Sep 4 2014.

VOLKOVA, M.; RUSSELL, R., 3rd. Anthracycline cardiotoxicity: prevalence, pathogenesis and treatment. **Curr Cardiol Rev**, 7, n. 4, p. 214-220, Nov 2011.

VOLM, M.; KOOMAGI, R.; MATTERN, J. Interrelationships between microvessel density, expression of VEGF and resistance to doxorubicin of non-small lung cell carcinoma. **Anticancer Res**, 16, n. 1, p. 213-217, Jan-Feb 1996.

WANG, G.; ZHANG, J.; LIU, L.; SHARMA, S. *et al.* Quercetin potentiates doxorubicin mediated antitumor effects against liver cancer through p53/Bcl-xl. **PLoS One**, 7, n. 12, p. e51764, 2012.

WANG, J.; LI, D.; CANG, H.; GUO, B. Crosstalk between cancer and immune cells: Role of tumor-associated macrophages in the tumor microenvironment. **Cancer Med**, 8, n. 10, p. 4709-4721, Aug 2019.

WEBER, C. E.; KUO, P. C. The tumor microenvironment. **Surg Oncol**, 21, n. 3, p. 172-177, Sep 2012.

WEIHRAUCH, M.; HANDSCHIN, C. Pharmacological targeting of exercise adaptations in skeletal muscle: Benefits and pitfalls. **Biochem Pharmacol**, 147, p. 211-220, Jan 2018.

WEINSTEIN, D. M.; MIHM, M. J.; BAUER, J. A. Cardiac peroxynitrite formation and left ventricular dysfunction following doxorubicin treatment in mice. **J Pharmacol Exp Ther**, 294, n. 1, p. 396-401, Jul 2000.

WENNINGMANN, N.; KNAPP, M.; ANDE, A.; VAIDYA, T. R. *et al.* Insights into Doxorubicin-induced Cardiotoxicity: Molecular Mechanisms, Preventive Strategies, and Early Monitoring. **Mol Pharmacol**, 96, n. 2, p. 219-232, Aug 2019.

WESTERLIND, K. C.; MCCARTY, H. L.; SCHULTHEISS, P. C.; STORY, R. *et al.* Moderate exercise training slows mammary tumour growth in adolescent rats. **Eur J Cancer Prev**, 12, n. 4, p. 281-287, Aug 2003.

WHITESIDE, T. L. The role of immune cells in the tumor microenvironment. **Cancer Treat Res**, 130, p. 103-124, 2006.

WHO. Cancer. p. <http://www.who.int/topics/cancer/en/>, 2013.

WING, S. S. Control of ubiquitination in skeletal muscle wasting. **Int J Biochem Cell Biol**, 37, n. 10, p. 2075-2087, Oct 2005.

WITLOX, L.; HIENSCH, A. E.; VELTHUIS, M. J.; STEINS BISSCHOP, C. N. *et al.* Four-year effects of exercise on fatigue and physical activity in patients with cancer. **BMC Med**, 16, n. 1, p. 86, Jun 8 2018.

WU, S.; ZHU, W.; THOMPSON, P.; HANNUN, Y. A. Evaluating intrinsic and non-intrinsic cancer risk factors. **Nat Commun**, 9, n. 1, p. 3490, Aug 28 2018.

YAGUE, E.; HIGGINS, C. F.; RAGUZ, S. Complete reversal of multidrug resistance by stable expression of small interfering RNAs targeting MDR1. **Gene Ther**, 11, n. 14, p. 1170-1174, Jul 2004.

YANG, L.; SHI, P.; ZHAO, G.; XU, J. *et al.* Targeting cancer stem cell pathways for cancer therapy. **Signal Transduct Target Ther**, 5, p. 8, 2020.

YI, H.; CHO, H. J.; CHO, S. M.; JO, K. *et al.* Blockade of interleukin-6 receptor suppresses the proliferation of H460 lung cancer stem cells. **Int J Oncol**, 41, n. 1, p. 310-316, Jul 2012.

YIN, Z.; PASCUAL, C.; KLIONSKY, D. J. Autophagy: machinery and regulation. **Microb Cell**, 3, n. 12, p. 588-596, Dec 1 2016.

YING, J.; TSUJII, M.; KONDO, J.; HAYASHI, Y. *et al.* The effectiveness of an anti-human IL-6 receptor monoclonal antibody combined with chemotherapy to target colon cancer stem-like cells. **Int J Oncol**, 46, n. 4, p. 1551-1559, Apr 2015.

YOUNG, L. C.; CAMPLING, B. G.; COLE, S. P.; DEELEY, R. G. *et al.* Multidrug resistance proteins MRP3, MRP1, and MRP2 in lung cancer: correlation of protein levels with drug response and messenger RNA levels. **Clin Cancer Res**, 7, n. 6, p. 1798-1804, Jun 2001.

YU, A. P.; PEI, X. M.; SIN, T. K.; YIP, S. P. *et al.* Acylated and unacylated ghrelin inhibit doxorubicin-induced apoptosis in skeletal muscle. **Acta Physiol (Oxf)**, 211, n. 1, p. 201-213, May 2014.

YU, M.; KING, B.; EWERT, E.; SU, X. *et al.* Exercise Activates p53 and Negatively Regulates IGF-1 Pathway in Epidermis within a Skin Cancer Model. **PLoS One**, 11, n. 8, p. e0160939, 2016.

YUAN, X. W.; ZHU, X. F.; HUANG, X. F.; SHENG, P. Y. *et al.* Interferon-alpha enhances sensitivity of human osteosarcoma U2OS cells to doxorubicin by p53-dependent apoptosis. **Acta Pharmacol Sin**, 28, n. 11, p. 1835-1841, Nov 2007.

YUAN, Y.; JIANG, Y. C.; SUN, C. K.; CHEN, Q. M. Role of the tumor microenvironment in tumor progression and the clinical applications (Review). **Oncol Rep**, 35, n. 5, p. 2499-2515, May 2016.

ZHANG, A. M.; FAN, Y.; YAO, Q.; MA, H. *et al.* Identification of a cancer stem-like population in the Lewis lung cancer cell line. **Asian Pac J Cancer Prev**, 13, n. 3, p. 761-766, 2012.

ZHANG, F.; DUAN, S.; TSAI, Y.; KENG, P. C. *et al.* Cisplatin treatment increases stemness through upregulation of hypoxia-inducible factors by interleukin-6 in non-small cell lung cancer. **Cancer Sci**, 107, n. 6, p. 746-754, Jun 2016.

ZHANG, H. H.; GUO, X. L. Combinational strategies of metformin and chemotherapy in cancers. **Cancer Chemother Pharmacol**, 78, n. 1, p. 13-26, Jul 2016.

ZHENG, R.; CHEN, G.; LI, X.; WEI, X. *et al.* Effect of IL-6 on proliferation of human thyroid anaplastic cancer stem cells. **Int J Clin Exp Pathol**, 12, n. 11, p. 3992-4001, 2019.

ZHENG, X.; CUI, D.; XU, S.; BRABANT, G. *et al.* Doxorubicin fails to eradicate cancer stem cells derived from anaplastic thyroid carcinoma cells: characterization of resistant cells. **Int J Oncol**, 37, n. 2, p. 307-315, Aug 2010.

ZHONG, H.; DAVIS, A.; OUZOUNOVA, M.; CARRASCO, R. A. *et al.* A Novel IL6 Antibody Sensitizes Multiple Tumor Types to Chemotherapy Including Trastuzumab-Resistant Tumors. **Cancer Res**, 76, n. 2, p. 480-490, Jan 15 2016.

ZIELINSKI, M. R.; MUENCHOW, M.; WALLIG, M. A.; HORN, P. L. *et al.* Exercise delays allogeneic tumor growth and reduces intratumoral inflammation and vascularization. **J Appl Physiol (1985)**, 96, n. 6, p. 2249-2256, Jun 2004.

ZILINYI, R.; CZOMPA, A.; CZEGLEDI, A.; GAJTKO, A. *et al.* The Cardioprotective Effect of Metformin in Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity: The Role of Autophagy. **Molecules**, 23, n. 5, May 15 2018.

APÊNDICES

APÊNDICE A- Artigo publicado no “Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle” (16/02/2016)

ORIGINAL ARTICLE

Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle 2016; 7: 615–625

Published online 15 February 2016 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com) DOI: 10.1002/jcsm.12104

Doxorubicin caused severe hyperglycaemia and insulin resistance, mediated by inhibition in AMPk signalling in skeletal muscle

Edson Alves de Lima Junior¹, Alex Shimura Yamashita², Gustavo Duarte Pimentel³, Luís G. O. De Sousa⁴, Ronaldo Vagner T Santos⁵, Cinara Ludvig Gonçalves⁶, Emilio Luiz Streck⁶, Fábio Santos de Lira⁷ & Jose Cesar Rosa Neto^{1*}

¹Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento, Instituto de Ciências Biomédicas I, Avenida Lineu Prestes 1524, Cidade Universitária 05508-900, São Paulo, SP, Brazil; ²Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil; ³Laboratório de Investigação em Nutrição Clínica e Esportiva (Labince), Faculdade de Nutrição (FANUT), Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia, Goiás, Brasil; ⁴Department of Neurobiology, Physiology and Behavior, University of California Davis, Davis, CA 95616, USA; ⁵Departamento de Biociências, UNIFESP, São Paulo, SP, Brasil; ⁶Laboratório de Fisiopatologia Experimental, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Av. Universitária, 1105, Criciúma 88806-000 SC, Brazil; ⁷Exercise and Immunometabolism Research Group, Department of Physical Education, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Rua Roberto Simonsen, 30519060-900, Presidente Prudente, São Paulo, Brazil

Abstract

Background Cancer is considered the second leading cause of death in the world, and for the treatment of this disease, pharmacological intervention strategies are frequently based on chemotherapy. Doxorubicin (DOX) is one of the most widely used chemotherapeutic agents in clinical practice for treating a number of solid tumours. The treatment with DOX mimics some effects of cancer cachexia, such as anorexia, asthenia, decreases in fat and skeletal muscle mass and fatigue. We observed that treatment with DOX increased the systemic insulin resistance and caused a massive increase in glucose levels in serum. Skeletal muscle is a major tissue responsible for glucose uptake, and the positive role of AMPk protein (AMP-activated protein kinase) in GLUT-4 (Glucose Transporter type 4) translocation, is well established. With this, our aim was to assess the insulin sensitivity after treatment with DOX and involvement of AMPk signalling in skeletal muscle in this process.

Methods We used Wistar rats which received a single dose of doxorubicin (DOX group) or saline (CT group) intraperitoneally at a dose of 15 mg/kg b.w. The expression of proteins involved in insulin sensitivity, glucose uptake, inflammation, and activity of electron transport chain was assessed in extensor digitorum longus muscle, as well as the histological evaluation. *In vitro* assays were performed in L6 myocytes to assess glucose uptake after treatment with DOX. Agonist of AMPk [5-aminoimidazole-4-carboxamide (AICAR)] and the antioxidant n-acetyl cysteine were used in L6 cells to evaluate its effect on glucose uptake and cell viability.

Results The animals showed a significant insulin resistance, hyperglycaemia, and hyperinsulinemia. A decrease in the expression of AMPk and GLUT-4 was observed in the extensor digitorum longus muscle. Also in L6 cells, DOX leads to a decrease in glucose uptake, which is reversed with AICAR.

Conclusions DOX leads to conditions similar to cachexia, with severe glucose intolerance both *in vivo* and *in vitro*. The decrease of AMPk activity of the protein is modulated negatively with DOX, and treatment with agonist of AMPk (AICAR) has proved to be a possible therapeutic target, which is able to recover glucose sensitivity in skeletal muscle.

Keywords Doxorubicin; Skeletal muscle; AMPk; Glucose intolerance; Hyperglycaemia; Chemotherapy; Anthracycline

Received: 10 November 2014; Revised: 01 December 2015; Accepted: 11 January 2016

*Correspondence to: Jose Cesar Rosa Neto, Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento, Instituto de Ciências Biomédicas I, Av. Lineu Prestes 1524, CEP 05508-900, Cidade Universitária, São Paulo, Brasil; Tel: 05511-30910883, Fax: 05511-30910883, Email: josecesar23@hotmail.com

Introduction

Doxorubicin (DOX) is a chemotherapeutic, in the family of anthracyclines, developed in the 1960s.¹ It is an antineoplastic antibiotic that is still widely used in the treatment of a variety

of malignancies, effective in acute leukaemia, non-Hodgkin lymphomas, breast cancer, Hodgkin's disease, and sarcomas.²

Doxorubicin exerts antitumor activity by inhibiting DNA Topoisomerase II, thus disrupting DNA replication.³ Moreover, DOX induces the generation of reactive oxygen species

(ROS) leading to DNA damage and apoptosis, by stimulation of p53-DNA binding, which initiates the caspase signalling, and DNA cross-linking.^{4,5}

Despite the great antitumoural efficiency of DOX, the use of this drug in therapy is limited, whereas since the 1970s, its cardiotoxicity was demonstrated in DOX treatment; therefore, this limits its use in cancer treatment.⁶ Although the deleterious effects of DOX on the heart muscle are the main targets of investigation discussed in the literature, skeletal muscle is also affected. DOX treatment causes severe fatigue⁷ and muscle weaknesses that reflect a poor quality of life.⁸ This tissue has important biological functions, and various metabolic disorders are related to changes in metabolism.

It has been shown that the decrease in insulin sensitivity in skeletal muscle may be secondary to a number of pharmacological therapies.^{9,10} In humans, skeletal muscle accounts for approximately 50–60% of body weight. In insulin-stimulated conditions, skeletal muscle is responsible for about 75% of uptake in circulating glucose.¹¹ Insulin resistance favours muscle wasting, a process called sarcopenia.^{12,13} Sarcopenia is part of the physiological ageing process, but it is also present in several morbidities, such as diabetes, cancer, and kidney disease, which affect the quality and life expectancy of individuals.^{14,15} Clinically, patients usually report severe fatigue during DOX treatment.¹⁶ Previous studies have shown that DOX is able to generate muscle dysfunction, leading to lost performance and the physical appearance of debilitating fatigue.^{17–19} Worsening in the parameters of maximum strength, maximum relaxation and fatigue were evident and were probably caused by changes in sarcoplasmic calcium metabolism.^{20,21}

However, few studies have been proposed to investigate a possible association between the use of DOX and insulin resistance, as well as the role of skeletal muscle in the process.

AMPk (AMP-activated protein kinase) is a protein with serine-threonine kinase residues,²² which acts as a key sensor of cellular energy levels. The activity of this protein appears to play a pivotal role in increasing glucose uptake in skeletal muscle. In 2005, Tokarska-Schlattner et al.²³ showed that this disruption in AMPk signalling negatively affected the energetic metabolism in cardiomyocytes of the animals treated with DOX. AMPk activation by 5-aminoimidazole-4-carboxamide (AICAR) riboside or genetic approach reduced DOX cardiotoxicity in culture cells.²⁴

The explanation of this condition is extremely important, because insulin resistance alters the pharmacokinetics of the drug, increases cardiotoxicity, and increases oxidative stress.^{25,26} Therefore, the skeletal muscle has an important role in glucose and insulin homeostasis. Accordingly, the aim of this study was to evaluate insulin sensitivity after treatment with DOX and involvement of AMPk signalling in skeletal muscle in this process.

Methods

Animals

The Experimental Research Committee of the University of São Paulo approved all procedures for the care of the animals used in this study. A total of 26 male Wistar rats approximately 14 weeks of age were used. They were housed four per cage in an animal room under a 12 h light-dark cycle at 22 ± 1°C and 60 ± 5% humidity and received a chow diet and water *ad libitum*. The experiments were carried out after a one-week acclimation period. Rats were randomly divided into two groups: (i) saline control (CT) ($n = 13$) and (ii) DOX group (DOX) ($n = 13$). After the acclimation period, the DOX-treated group received 15 mg/kg, i.p., DOX chloridrate (Eurofarma Laboratory, Campinas, Brazil); control animals received an equal volume of saline. Food intake and body weight were assessed daily.

The animals performed 6 h of fasting previous to euthanasia, by decapitation, 72 h after the DOX treatment. Following euthanasia, *extensor digitorius longus* (EDL) and retroperitoneal adipose tissue were removed, weighted, snap frozen in liquid nitrogen, and stored at –80°C. The epididymal adipose tissue and liver were only weighed. Whole blood was drawn, centrifuged at 3000 g for 15 min at 4°C. Serum was removed and kept frozen at –80°C for later determination.

Serum analysed

Fasting blood glucose, uric acid, and aspartate transaminase was assessed using Labtest® kits. Serum insulin, adiponectin, testosterone, and corticosterone were quantified using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). For insulin the kit was obtained from Millipore Corp. Bedford, MA, USA, for adiponectin the kit was obtained from R&D Systems, Minneapolis, MN, USA, and for corticosterone and testosterone from Assay Designs, Inc., Ann Arbor, MI, USA. Serum free fatty acid (FFA) levels were analysed in rats using the NEFA-kit-U (Wako Chemical GmbH, Neuss, Germany). Homeostatic model assessment of insulin resistance was used to evaluate insulin resistance. The index was determined by calculating: fasting serum insulin ($\mu\text{U/mL}$) \times fasting plasma glucose (mmol l⁻¹)/22.5.

Histology analysis

The EDL muscle was cut in cryostat sections (10 μm thick) at –25 ° temperature. The sections were incubated with hematoxylin and eosin for the analysis of cross-sectional area of the fibre (aspartate transaminase). The morphometric analysis was analysed under a microscope (Nikon Eclipse E600, Fukuoka, Japan) equipped with a digital video camera

coupled to software to analyse the images (Metamorph, Universal Corporation, Downingtown, USA). The scanned images were analysed using Image-Pro Plus (Media Cybernetics, Silver Spring, MD) software in a double-blind manner. For analysis of cross-sectional area of the fibre, approximately 1000 EDL muscle fibres were analysed per group. Four to five EDL fields per animal were analysed in groups studied.

Enzymatic assays

The EDL muscle was homogenized in SETH buffer, pH 7.4 (250 mM sucrose, 2 mM EDTA, 10 mM Trizma base, and 50 IU/mL heparin). The enzymatic activity of citrate synthase, malate dehydrogenase, and mitochondrial complexes 1 and 3 were performed as described in²⁷.

Intraperitoneal tolerance test

Forty-eight hours after starting treatment, some of the animals were subjected to the insulin tolerance test (ITT). After 6 h fasting, insulin (2 IU/kg) was administered by intraperitoneal injection, and blood samples were collected from the tail at 0, 5, 10, 15, 20, 25, and 30 min for measurement of serum glucose.

Quantitative real-time polymerase chain reaction

Total RNA from the EDL muscle was extracted with Trizol reagent (Invitrogen Life Technologies)²⁸ and reverse transcribed to cDNA using the High-Capacity cDNA kit (Applied Biosystems). Gene expression was evaluated by real-time PCR using a Rotor Gene (Qiagen) and SYBR Green as fluorescent dye. Primer sequences are shown in Table S1. Quantification of gene expression was carried,²⁹ with RPL-19 gene as an internal control. Primer sequences are shown in Table S1.

Protein analysis by western blotting

The EDL muscle and L6 myocytes were lysed in extraction buffer containing protease and phosphatase inhibitors. The extracts were then centrifuged at 12 000 rpm at 4°C for 40 min to remove insoluble material. Protein determination in the supernatants was performed by the Bradford dye method using the Bio-Rad reagent (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). The proteins were treated with a Laemmli sample buffer containing dithiothreitol and boiled for 5 min before loading into 10% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis in a Bio-Rad miniature slab gel apparatus. Electrotransfer of proteins from the gel to nitrocellulose was performed for ~1 h at 15 V (constant) in a Bio-Rad semi-dry transfer apparatus. Non-specific protein binding to the nitrocellulose was reduced by preincubation for 1 h at 22°C in a blocking buffer (5% nonfat

dry milk, 10 mM Tris, 150 mM NaCl, and 0.02% Tween 20). The nitrocellulose membranes were incubated overnight at 4°C with antibodies against Akt/PKB, and phospho Akt S473, AMPK α , phospho AMPK α ^{T172}, and IR (insulin receptor) were obtained from Cell Signaling Technology® (Danvers, MA, USA). GLUT-4 (glucose transporter 4), GAPDH, and b-tubulin were obtained from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) diluted in blocking buffer added with 1% bovine serum albumin (BSA) and then washed for 1 h in a blocking buffer without BSA. The blots were subsequently incubated with peroxidase-conjugated secondary antibody for 1 h.

By evaluation of protein loading, membranes were stripped and reblotted with GAPDH or b-tubulin antibody, as appropriate. Specific bands were detected by chemiluminescence, and visualization/capture was performed by exposure of the membranes to RX films. Band intensities were quantified by optical densitometry of developed autoradiographs (Scion Image software-Scion Corporation, Frederick, MD, USA).

L6 cell culture

The cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium at 37°C in humidified atmosphere containing 5% CO₂ and supplemented with 10% fetal bovine serum and 2% antibiotic solution. To differentiate, cells were allowed to reach confluence, and the medium was changed to medium containing 2% fetal bovine serum for 7 days, with medium changes every 2nd day. The serum was removed for 6 h for the determination of glucose uptake ability.

MTT assay

For the assessment of cell viability, MTT assay was performed. 2×10^4 cells per well in 96-well plates were cultivated and were differentiated after 24 h. Cells were treated with different concentrations of DOX (0 to 1 μ Mol) for 48 h, and after this period, we performed the cell viability assay. The cells' medium was replaced with 200 μ L fresh medium/well containing 0.125 mg/mL MTT and cultivated for another 3 h darkened in the cells' incubator. The supernatant was removed (until reaching a final volume of 25 μ L), and 100 μ L isopropanol/HCl (11 M) were added per well. The absorbance at 595 nm was measured. Two wells per plate without cells served as a blank. The effect of the DOX on cell viability was relativized by DMSO group.

Glucose uptake assay

Glucose uptake in L6 cells was measured using the 2-deoxy-[C14]-D-glucose. The 5.9×10^4 cells per well in 24-well plates were seeded and were differentiated after 24 h, with a confluence of approximately 80%. Differentiated L6 cells were treated with 100 nMol of DOX or DMSO for 48 h. To evaluate the chronic effect of AICAR, this drug was added together to start treatment with DOX (2 mMol/48 h).

For the glucose uptake assay the cells remained fasting (serum-free medium) for 6 h. After this, cells were washed in

PBS, glucose-free medium (Hepes, 140 mmol NaCl, 20 mmol Hepes-Na pH 7.4, 5 mmol KCl, 2.5 mmol MgSO₄, and 1 mmol CaCl₂) was added for 30 min, with or without insulin (100 nmol) or AICAR (2 mmol/1 h—only for the acute treatment). After this, Hepes medium containing 2-deoxy-[C14]-D-glucose (1 mCi/mL) was added for 30 min. Reactions were terminated by washing twice in ice-cold NaCl (0.9%), cells were digested (50 mmol NaOH), and part of the sample was used for total protein quantification by Bradford, and in part transferred to a scintillation vial with liquid scintillant. The radioactivity was measured by beta counter.

TNF- α , IL-10, IL-6, and adiponectin protein level determination

Frozen tissues (0.1–0.3 g) were homogenized in radio immunoprecipitation assay buffer (0.625% Nonidet P-40, 0.625% sodium deoxycholate, 6.25 mM sodium phosphate, and 1 mM ethylenediamine tetra acetic acid at pH 7.4) containing 10 μ g/mL of a protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri). Homogenates were centrifuged at 12 000 g for 10 min at 4°C, the supernatant was saved, and protein concentration was determined using the Bradford assay (Bio-Rad, Hercules, California) with bovine serum albumin as a reference. Quantitative assessment of TNF- α , IL-6, IL-10, and adiponectin proteins was carried out by ELISA (DuoSet ELISA, R&D Systems, Minneapolis, MN). All samples were run as duplicates, and the mean value was reported.

Statistical analysis

The statistical analysis was performed using the GraphPad Prism statistics software package version 5.0 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). The data are expressed as the means \pm SD. Implementation of the Kolmogorov–Smirnov test revealed that the results of experiments were distributed normally. The data were analysed using a Student's *t*-test for comparison between two groups. For comparison of assays in cell culture, the ANOVA one-way with Tukey post-test test, or ANOVA two-way test with Bonferroni post-test were used. A value of *P* < 0.05 was considered statistically significant.

Results

Doxorubicin chemotherapy leads to severe anorexia and sarcopenia-like morbidity

Treatment with DOX causes a marked decrease in body weight and relevant anorectic condition (Table 1). Seventy-two hours after the initial application of chemotherapy, a severe drop in the weight of epididymal adipose pad (Table 1) and EDL skeletal

Table 1 Doxorubicin leads to a severe loss of body weight and anorexia with a disruption in systemic metabolism

| | CT | DOX |
|-------------------------------|------------------|-----------------------|
| Delta body weight (g) | 12.78 \pm 1.26 | -30.05 \pm 1.46 *** |
| Food intake (g/day) | 27.10 \pm 2.30 | 4.58 \pm 0.70 *** |
| Epididymal adipose tissue (g) | 5.99 \pm 0.27 | 4.00 \pm 0.32 ** |
| Glucose (mg/dl) | 143.2 \pm 2.78 | 310.7 \pm 11.13 *** |
| NEFA (mEq/L) | 0.62 \pm 0.02 | 0.72 \pm 0.03 * |
| Insulin (ng/mL) | 1.68 \pm 0.12 | 2.46 \pm 0.31 * |

Values represent the means and \pm SD of the data obtained from analysis of 8–10 animals per group.

**P* < 0.05.

***P* < 0.01.

****P* < 0.001 vs. CT.

muscle (Figure 1A) was observed. No change in the weight of the liver, adrenal, and retroperitoneal adipose tissue (Table 2S) was observed. The high levels of aspartate aminotransferase (AST) and uric acid confirm the deleterious effects of chemotherapy with DOX on hepatic and renal function (Table 2S).

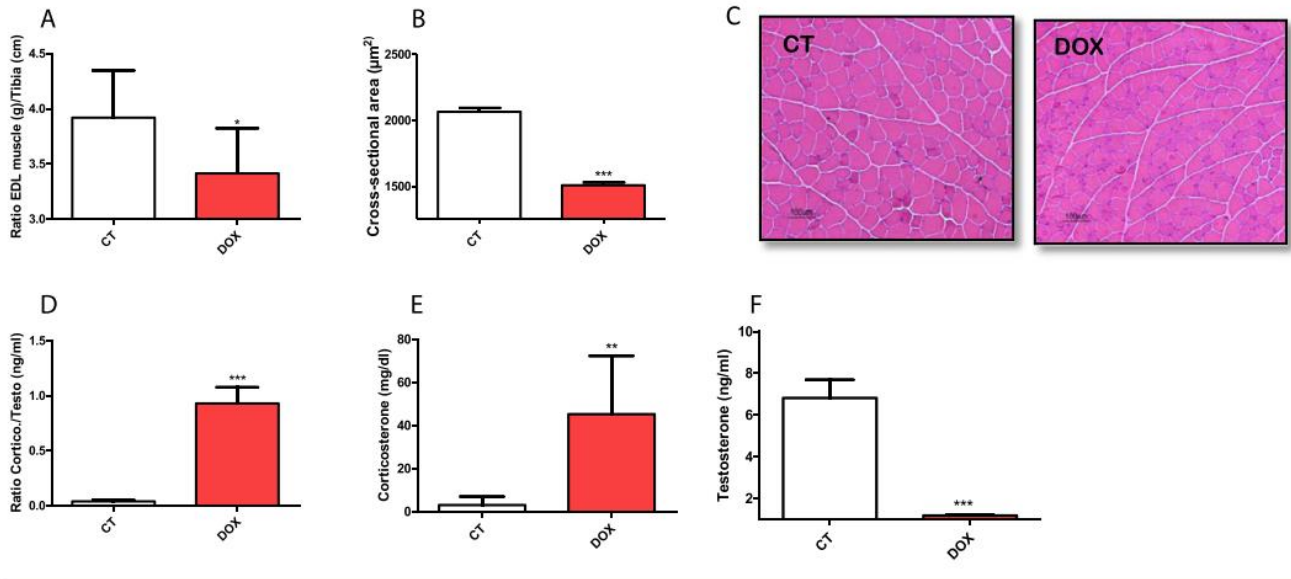
Corroborating with the drop in the weight of the EDL muscle, the application of DOX induced a reduction of its cross-sectional area (Figure 1B and 1C). To better characterize the systemic change of the use of DOX on the regulation of the control mechanisms of the processes of protein synthesis and degradation, we evaluated the circulating concentration of the two main steroid hormones that regulate these processes. Significantly higher levels of corticosterone/testosterone ratio were found in the DOX group (Figure 1D), resulting from increased levels of corticosterone (Figure 1E) and suppression of circulating testosterone (Figure 1F), thus confirming the high catabolic state of our experimental model.

Acute treatment with doxorubicin increases systemic insulin resistance

Doxorubicin groups showed substantial increased levels of insulin, glucose, and FFA (Table 1) in serum, after 72 h of DOX treatment (15 mg/kg). Meanwhile, the protein expression of adiponectin in serum and retroperitoneal adipose tissue was decreased (data in press).

The quantification of insulin resistance by homeostatic model assessment of insulin resistance demonstrates that the DOX group has less sensitivity to insulin in the basal state (Figure 2A). The ITT confirmed the impaired insulin sensitivity, under insulin stimulus, in the group treated with DOX compared with the control group. The intraperitoneal tolerance test of insulin was performed to evaluate the response of DOX treatment 48 hours after administration of the drug. DOX treated animals showed higher glucose blood levels at each time interval (0, 5, 10, 15, 20, 25 and 30 minutes) (Figure 2B). Serum glucose disappearance rate (Kitt) during the ITTs was dramatically decreased in the group treated with DOX (Figure 2C).

Figure 1 Effect of doxorubicin on muscular atrophy and the electron transport chain activity. (A) Ratio muscle extensor digitorum longus/tibia. (B) Cross-sectional area in extensor digitorum longus muscle. (C) Histological slices of the extensor digitorum longus muscle stained with H & E. (D) Ratio corticosterone/testosterone. (E) Corticosterone levels. (F) Testosterone levels. The groups were compared by Test T. $P < 0.05$ was considered statistically significant. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. $n = 4-10$.



However, protein levels of insulin receptor (Figure 2E and 2F) and gene and protein expression of AKT protein downstream of PI3-K were not altered (Figure 2D, 2E, and 2F) in the EDL muscle after treatment. Nevertheless, other proteins involved in the insulin pathway showed decreased gene expression, such as IRS-1, GSK3- β (Figure 2D) in skeletal muscle.

The activity of AMP-activated protein kinase protein is decreased with treatment with doxorubicin

GLUT4 and AMPK α (p^{T172}) were decreased in mRNA and protein levels (Figure 2D, 2E, and 2F). Our *in vitro* data corroborate with the decrease of GLUT4 expression and phosphorylation of AMPK α observed in the EDL muscle (Figure 2G and 2H). After 48 h, the L6 myocyte culture treated with DOX presents a decreased phosphorylation of AMPK α in the residue T172, without changing its overall content. The GLUT-4 expression was also reduced in the treatment. These data suggest that although the insulin signalling cascade has not been completely disrupted, important proteins with effective participation in glucose uptake are less expressed.

Treatment with doxorubicin decreases glucose uptake in L6 myocytes and this effect is reversed by chronic activation of AMP-activated protein kinase

Our results in isolated myocytes confirm our hypothesis that metabolic chaos generated by this drug on carbohydrate

metabolism is due in part to impaired glucose uptake in both the stimulated and basal state (Figure 3A).

Accordingly, myocytes were treated with DOX and AICAR acutely (1 h) or chronically (48 h). As previously demonstrated, *in vitro* treatment with DOX decreased the phosphorylation of AMPK. The acute intervention (1 h) with AICAR is effective in phosphorylation of this protein in control and treated group with DOX compared with the group treated only with DOX. We did not find an increase in the phosphorylation of AMPK α after chronic treatment (48 h) with AICAR (Figure 3B, 3C, and 3D).

Intervention with AICAR recovers glucose uptake in myocytes treated with DOX. By 48 h, the reestablishment of glucose uptake was complete (Figure 3E). Despite the fact that treatment with AICAR for 1 h increased uptake, it was not enough to be statistically significant compared with the group treated with DOX.

Cell viability was increased by n-acetyl cysteine treatment, but the glucose uptake was not restored by n-acetyl cysteine

The deleterious role of oxidative stress in chemotherapy treatment, especially with DOX has been well established in cardiac and skeletal muscle tissue. Indeed, our results suggest a potential increase in production of ERO's, because treated animals had increased activity of mitochondrial complex 1 and a decrease in activity of mitochondrial Complex 3 (Figure 4A).

Figure 2 Doxorubicin leads to impaired systemic insulin sensitivity. (A) Homeostatic model assessment of insulin resistance. (B) Curve of the insulin tolerance test. (C) Kitt. (D) Gene expression involved in glucose metabolism. (E/F) protein expression involved in glucose metabolism in extensor digitorum longus muscle. (G/H) AMPk and GLUT-4 protein expression in culture L6 myocytes treated with doxorubicin. The groups were compared by Test T. $P < 0.05$ was considered statistically significant. * $P < 0.5$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. $n = 3-8$.

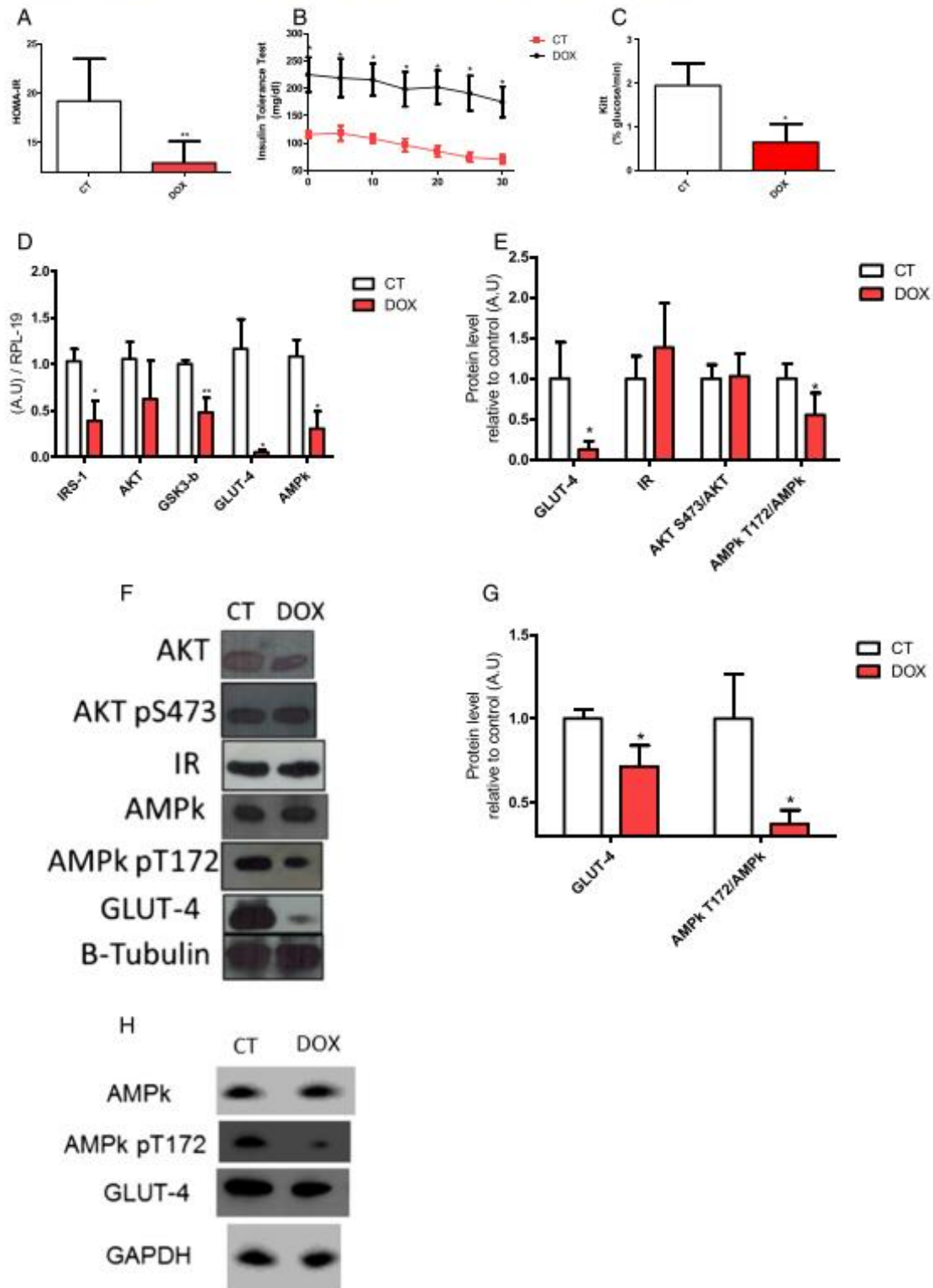
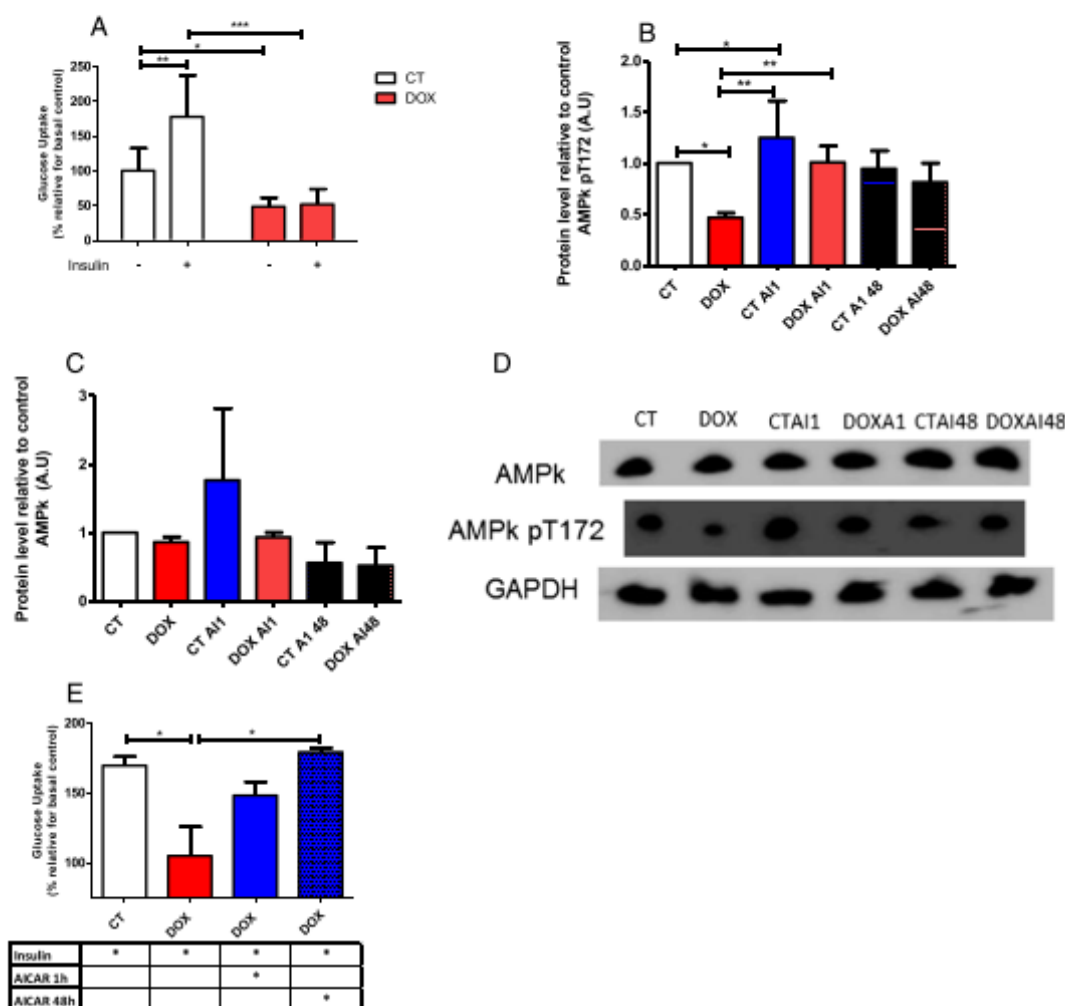


Figure 3 Doxorubicin decrease glucose uptake in L6 cells, which is recovered with chronic treatment with AICAR. (A) The L6 cells were differentiated and submitted to the glucose uptake assay, with (plus sign) and without (minus sign) insulin stimulation (100 nM), after 48 h the treatment with doxorubicin (100 nM). (B–D). Effect of acute and chronic treatment with AICAR on the phosphorylation of AMPK in myocytes. (E) 2-Deoxy-[C14]-D-glucose uptake in L6 cells. This cells were subjected to treatment with doxorubicin, associated with insulin, and submitted to acute (1 h) or chronic (48 h) AICAR (2 mmol) treatment; The results were relativized by control group without insulin stimulation. For the glucose uptake assay the groups were compared using ANOVA two-way test with Bonferroni post-test to compare the groups. $P < 0.05$ was considered statistically significant. * $P < 0.5$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. $n = 4-6$.



To assess whether oxidative stress could be involved in the decrease in cell viability we treated L6 myocytes with DOX for 48 h at a concentration of 1 mmol in the presence or absence of NAC (20 mmol/high concentration and 2 mmol/low concentration). As shown in Figure S2A, the concentration of DOX 1 mmol leads to a decrease in cell viability, whereas the chronic treatment with high concentrations of NAC (20 mmol) reverses this effect (Figure S2B). Low concentrations of NAC were not able to reverse the cell viability.

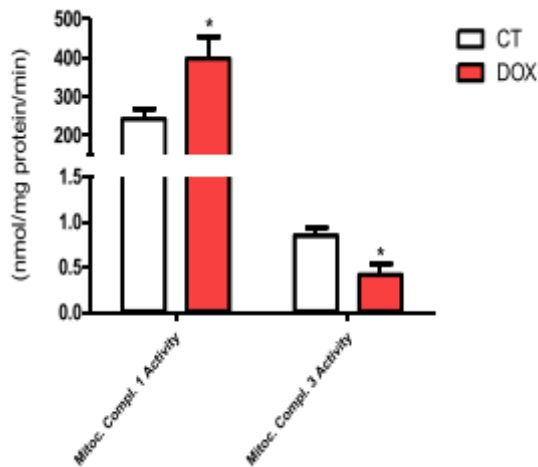
We investigated whether treatment with the antioxidant NAC reverses glucose uptake in the myocytes treated with this chemotherapeutic agent. Our data show that the treatment with NAC was unable to reverse the reduction in glucose uptake resulting from treatment with DOX (Figure S2C).

Doxorubicin-induced decreased the proinflammatory cytokines protein content

Pro-inflammatory cytokine levels (IL-6/TNF- α) were not elevated compared with the control group (Figure S3A), including decreased levels of anti-inflammatory cytokine IL-10. Still, the content of IL-6 released into the medium of myocytes treated with DOX in the presence of LPS is decreased compared with the control group treated with LPS (Figure S3B).

The pathway of inflammasome also seems to be not involved in this process, because the expression of IL-1 β , as well as proteins involved in the maturation of this protein, was not modulated by treatment (Figure S3C).

Figure 4 Mitochondrial complex 1 and 3 activity. The groups were compared by Test T. $P < 0.05$ was considered statistically significant. * $P < 0.5$. $n = 4-6$.



Discussion

Our main results suggest that treatment with DOX caused hyperglycaemia and insulin resistance mediated by inhibition in AMPk, moreover, the treatment leads to atrophy, weight loss, and anorexia mimicking similar conditions to cachexia. In addition, we observed that rats treated with DOX showed hyperglycaemia, insulin resistance (kITT), increases in FFA, and corticosterone serum concentration. To our knowledge, this is the first study to demonstrate an association between treatment with DOX and insulin resistance in skeletal muscle metabolism.

Chemotherapy can alter insulin sensitivity in clinical practice.^{30,31} The treatment with DOX causes the deterioration in glucose metabolism both *in vivo* and *in vitro*. Recently, Arunachalam and colleagues³² review that DOX may mimic type 2 diabetes, whereas the adipose tissue metabolism was negatively affected. We showed that skeletal muscle plays a significant role in this condition, with dramatically reduced GLUT-4 protein and mRNA expression in the animal model, and DOX treatment decreased the glucose uptake in the basal and stimulated condition in L6 myocytes.

Insulin is a key hormone in glucose uptake in skeletal muscle. The activation of proteins involved in signalling of this hormone is essential for the translocation of GLUT4 from intracellular vesicles to the sarcolemma. Dysfunction of proteins in this pathway causes a strong insulin resistance.^{33,34} Our data showed a decrease in insulin sensitivity, whereas in the kITT test, the DOX group showed decreases in the kITT constant. However, in molecular levels our results suggest that the signalling cascade of insulin is not completely disrupted, although important proteins with effective participation in glucose uptake are less expressed. The protein levels of insulin receptors and gene and protein expression of AKT

protein downstream of PI 3-kinase were not affected in the EDL muscle after treatment. Nevertheless, other proteins involved in glucose metabolism had decreased expression such IRS-1 and GS3kb mRNA expression, and GLUT-4 mRNA and protein expression. Even with a partially competent signalling of insulin, the need for this glucose transporter is essential as demonstrated by studies using a knockout model for GLUT4.³⁵

Several hypotheses were reported to trigger the development of glucose intolerance. It is well established that DOX increases oxidative stress and mitochondrial dysfunction,^{36,37} including in skeletal muscle,^{38,39} which both mechanisms are important to lead the insulin resistance. DOX leads to increased ROS through different mechanisms. The interaction of this drug with iron III, the perturbation of regulation of nitric oxide (NO), and the redox cycling of this drug, which takes place by reoxidation of radical DOX-semiquinone to DOX, leads to the formation of ROS.⁴⁰⁻⁴²

Although our data suggest that treatment with DOX alters the activity of mitochondrial complexes, leading to a proton gradient that is favourable to the formation of ROS with increases in activity of the Complex I and inhibition of Complex III, which are important sites where there is formation of ROS.^{43,44} Many studies showed the strong association between oxidative stress and a decrease in glucose uptake in skeletal muscle.⁴⁵⁻⁴⁸ But the treatment with the antioxidant *n*-acetylcysteine (NAC) was not able to reverse the decrease in glucose uptake induced by DOX in L6 culture. However, when cells were treated with concentrations of DOX capable of decreasing cell viability, antioxidant treatment (high concentrations of NAC) was able to reverse this effect. Probably, the absence of effect in restored the glucose uptake after NAC treatment occurs because the oxidative stress leads to impair in glucose uptake mediated by insulin response,⁴⁶ and the contribution of this pathway in glucose intolerance is less effective after the DOX treatment. Whereas, the main pathway disrupted by DOX is the AMPk signalling in skeletal muscle. The AMPk is the other major regulator of glucose transport, and it leads to GLUT-4 for the sarcolemma independently of insulin.

Additionally, AMPk regulates the gene expression of GLUT-4 to the activation and translocation of transcription factors into the nucleus to bind to the promoter of the GLUT4 gene region, as the MEF2A (myocytes enhancer factor) and GEF (GLUT4 enhancer factor).^{49,50}

Our data demonstrated a large inhibition of GLUT-4 protein expression in EDL in rats treated with DOX. Together with this, the AMPk mRNA expression and phospho AMPk α^{thr172} follow the decreases in the GLUT-4 protein. Because of this we hypothesized that AMPk signalling was disrupted in skeletal muscle in the DOX group. We evaluated the treatment with an agonist of AMPk, AICAR, that was able to completely reverse glucose uptake stimulated by insulin in L6 myocytes.

Other important regulator of AMPk pathway and glucose uptake is the adiponectin, an adipokine produced in adipose tissue and responsible by a cross link between it and other tissues, because its circulating concentration positively

correlated with an insulin sensitivity. The adiponectin expression in adipose tissue and the circulating levels was decreased (data not shown) in the DOX group and may be explained, at least in part, by the decrease in AMPk activity and mRNA expression, whereas adiponectin is a positive modulator of AMPk activity.⁵¹ Beyond the adiponectin, the Interleukin-6 increased the AMPk activity in myocytes.^{52,53} In our results, the DOX treatment inhibits the IL-6 released in L6 myocytes after LPS stimulation, although this phenomenon did not occur *in vivo*.

Our results showed that DOX treatment lead animals to develop a cachexia-like syndrome. Cachexia is characterized as a multifactorial syndrome, in which there is involuntary weight loss.⁵⁴ In agreement with other supporting studies, the use of some chemotherapy drugs appears to contribute to the development of symptoms of cachexia, contributing to an unfavourable metabolic state.^{19,55,56} The DOX also caused increases in glucose intolerance, induced extreme atrophy, weight, and adipose tissue mass loss, anorexia, and a catabolic environment, as demonstrated by an increase in corticosterone/testosterone ratio, with a decrease in myocyte area.

The literature showed that inflammatory mediators are a possible mediator of glucose intolerance, sarcopenia, and anorexia. However, our results do not support this hypothesis in DOX treatment. Although TNF- α was decreased in the DOX group without changes in the protein content of the cytokine receptors assessed, there was no change in gene expression of proteins involved in the inflammassome pathway in muscle.

In conclusion, our results show that treatment with DOX leads to conditions similar to cachexia, with a severe glucose intolerance both *in vivo* and *in vitro*. The decrease of AMPk activity of the protein is modulated negatively with treatment and has proved to be a possible therapeutic target, which is able to recover glucose sensitivity in skeletal muscle, and can lead to improvements in quality of life in chemotherapy patients.

Acknowledgements

José Cesar Rosa Neto thanks the Fapesp support (2013/09367-4), and Fabio Santos Lira thanks the CNPq (481231/2012-9).

The authors certify that they comply with the ethical guidelines for publishing in the Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle: update 2015.⁵⁷

References

- Richardson DS, Johnson SA. Anthracyclines in haematology: preclinical studies, toxicity and delivery systems. *Blood Rev* 1997;11:201–223.
- Lai HC, Yeh YC, Ting CT, Lee WL, Lee HW, Wang LC, et al. Doxycycline suppresses doxorubicin-induced oxidative stress and cellular apoptosis in mouse hearts. *Eur J Pharmacol* 2010;644:176–187.
- Tewey KM, Rowe TC, Yang L, Halligan BD, Liu LF. Adriamycin-induced DNA damage mediated by mammalian DNA topoisomerase II. *Science* 1984;226:466–468.
- Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev* 2004;56:185–229.

Online supplementary material

Supporting Information is available at Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle online.

Table S1. Primer sequences of the genes studies for real-time PCR.

Table S2. Organs weight and hepatic and renal function.

Figure S1. Treatment with doxorubicin don't change the activity of mitochondrial oxidative enzymes in EDL muscle. The groups were compared by Test T. $p < 0.05$ was considered statistically significant. $n=3-5$.

Figure S2. Cell viability assay and 2-deoxy-[C14]-D-glucose uptake in L6 cells. A. Differentiated L6 cells were treated for 48 hours with doxorubicin in different concentrations. The MTT assay was performed thereafter to assess cell viability; B. Treatment with high concentrations of NAC reverses the viability of doxorubicin-treated myocytes. The groups were compared using ANOVA one-way test with Tukey post-test to compare the groups. $p < 0.05$ was considered statistically significant. * $p < 0,5$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$. $n=7$. C. 2-deoxy-[C14]-D-glucose uptake in L6 cells treated with NAC. This cells were subjected to treatment with doxorubicin, associated with insulin, and submitted or not to treatment with NAC. The results were relativized by control group without insulin stimulation. For the glucose uptake assay the groups were compared using ANOVA two-way test with Bonferroni post-test to compare the groups. $p < 0.05$ was considered statistically significant. * $p < 0,5$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. $n= 4-6$.

Fig. S3. Expression of proteins involved in inflammation and cytokines in skeletal muscle and myocytes. A. Concentration of cytokines TNF- α , IL-6 and IL-10 in the EDL muscle; B. IL-6 content in the middle of L6 myocytes after 24 hours of treatment with doxorubicin (100 nmol) in the presence or absence of LPS (1 $\mu\text{g} / \text{ml}$). C. Caspase 1, NLRP1 gene expression, NLRP-3 gene expression, NOD-1, NOD-2 and TLR-4 gene expression. $n=5-10$. The groups were compared by Test T. $p < 0.05$ was considered statistically significant. * $p < 0,5$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. $n = 4-7$.

Conflict of interest

Edson Alves de Lima Junior, Alex Shimura Yamashita, Gustavo, Pimentel, Luís Gustavo de Sousa, Ronaldo Vagner T. dos Santos, Cinara Gonçalves, Emílio Streck, Fábio Lira, and José Cesar Rosa Neto declare that they have no conflict of interests.

5. Fang J, Nakamura H, Iyer AK. Tumor-targeted induction of oxytress for cancer therapy. *J Drug Target* 2007;15:475–486.
6. Benjamin RS, Wiernik PH, Bachur NR. Adriamycin chemotherapy—efficacy, safety, and pharmacologic basis of an intermittent single high-dosage schedule. *Cancer* 1974;33:19–27.
7. Morrow GR, Andrews PL, Hickok JT, Roscoe JA, Matteson S. Fatigue associated with cancer and its treatment. *Support Care Cancer* 2002;10:389–398.
8. Gorselink M, Vaessen SF, van der Flier LG, Leenders I, Kegler D, Caldenhoven E, et al. Mass-dependent decline of skeletal muscle function in cancer cachexia. *Muscle Nerve* 2006;33:691–693.
9. Jacob S, Rett K, Wicklmayr M, Agrawal B, Augustin HJ, Dietze GJ. Differential effect of chronic treatment with two beta-blocking agents on insulin sensitivity: the carvedilol-metoprolol study. *J Hypertens* 1996;14:489–494.
10. Pagano G, Cavallo-Perin P, Cassader M, Bruno A, Ozzello A, Masciola P, et al. An in vivo and in vitro study of the mechanism of prednisone-induced insulin resistance in healthy subjects. *J Clin Invest* 1983;72:1814–1820.
11. DeFronzo RA, Gunnarsson R, Bjorkman O, Olsson M, Wahren J. Effects of insulin on peripheral and splanchnic glucose metabolism in noninsulin-dependent (type II) diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1985;76:149–155.
12. Honors MA, Kinzig KP. The role of insulin resistance in the development of muscle wasting during cancer cachexia. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 2012;3:5–11.
13. Srikanthan P, Hevener AL, Karlamangla AS. Sarcopenia exacerbates obesity-associated insulin resistance and dysglycemia: findings from the National Health and Nutrition Examination Survey III. *PLoS One* 2010;5:e10805.
14. Prado CM, Lieffers JR, McCargar LJ, Reiman T, Sawyer MB, Martin L, et al. Prevalence and clinical implications of sarcopenic obesity in patients with solid tumours of the respiratory and gastrointestinal tracts: a population-based study. *Lancet Oncol* 2008;9:629–635.
15. Sakkas GK, Kent-Braun JA, Doyle JW, Shubert T, Gordon P, Johansen KL. Effect of diabetes mellitus on muscle size and strength in patients receiving dialysis therapy. *Am J Kidney Dis* 2006;47:862–869.
16. Neidhart JA, Gochnour D, Roach R, Hoth D, Young D. A comparison of mitoxantrone and doxorubicin in breast cancer. *J Clin Oncol* 1986;4:672–677.
17. Stone P, Hardy J, Broadley K, Tookman AJ, Kurowska A, A'Hern R. Fatigue in advanced cancer: a prospective controlled cross-sectional study. *Br J Cancer* 1999;79:1479–1486.
18. Gilliam LA, Ferreira LF, Bruton JD, Moylan JS, Westerblad H, St Clair DK, et al. Doxorubicin acts through tumor necrosis factor receptor subtype 1 to cause dysfunction of murine skeletal muscle. *J Appl Physiol* (1985) 2009;107:1935–1942.
19. Gilliam LA, Moylan JS, Callahan LA, Sumandea MP, Reid MB. Doxorubicin causes diaphragm weakness in murine models of cancer chemotherapy. *Muscle Nerve* 2011;43:94–102.
20. van Norren K, van Helvoort A, Argiles JM, van Tuijl S, Arts K, Gorselink M, et al. Direct effects of doxorubicin on skeletal muscle contribute to fatigue. *Br J Cancer* 2009;100:311–314.
21. De Beer EL, Finkle H, Voest EE, Van Heijst BG, Schiereck P. Doxorubicin interacts directly with skinned single skeletal muscle fibres. *Eur J Pharmacol* 1992;214:97–100.
22. Steinberg GR, Kemp BE. AMPK in Health and Disease. *Physiol Rev* 2009;89:1025–1078.
23. Tokarska-Schlattner M, Zaugg M, da Silva R, Lucchinetti E, Schaub MC, Wallimann T, et al. Acute toxicity of doxorubicin on isolated perfused heart: response of kinases regulating energy supply. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;289:H37–H47.
24. Chen K, Xu X, Kobayashi S, Timm D, Jepperson T, Liang Q. Caloric restriction mimetic 2-deoxyglucose antagonizes doxorubicin-induced cardiomyocyte death by multiple mechanisms. *J Biol Chem* 2011;286:21993–22006.
25. Al-Shabanah OA, El-Kashef HA, Badary OA, Al-Bekairi AM, Elmazar MM. Effect of streptozotocin-induced hyperglycaemia on intravenous pharmacokinetics and acute cardiotoxicity of doxorubicin in rats. *Pharmacol Res* 2000;41:31–37.
26. Blasiak J, Arabski M, Krupa R, Wozniak K, Zadrozny M, Kasznicki J, et al. DNA damage and repair in type 2 diabetes mellitus. *Mutat Res* 2004;554:297–304.
27. Souza CO, Teixeira AA, Lima EA, Batatinha HA, Gomes LM, Carvalho-Silva M, et al. Palmitoic acid (n-7) attenuates the immunometabolic disturbances caused by a high-fat diet independently of PPARalpha. *Mediators Inflamm* 2014;2014:582197.
28. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156–159.
29. Liu W, Saint DA. Validation of a quantitative method for real time PCR kinetics. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;294:347–353.
30. Feng JP, Yuan XL, Li M, Fang J, Xie T, Zhou Y, et al. Secondary diabetes associated with 5-fluorouracil-based chemotherapy regimens in non-diabetic patients with colorectal cancer: results from a single-centre cohort study. *Colorectal Dis* 2013;15:27–33.
31. Chala E, Manes C, Iliades H, Skaragkas G, Mouratidou D, Kapantais E. Insulin resistance, growth factors and cytokine levels in overweight women with breast cancer before and after chemotherapy. *Hormones (Athens)* 2006;5:137–146.
32. Arunachalam S, Tirupathi Pichiah PB, Achiraman S. Doxorubicin treatment inhibits PPARgamma and may induce lipotoxicity by mimicking a type 2 diabetes-like condition in rodent models. *FEBS Lett* 2013;587:105–110.
33. Jiang ZY, Zhou QL, Coleman KA, Chouinard M, Boese Q, Czech MP. Insulin signaling through Akt/protein kinase B analyzed by small interfering RNA-mediated gene silencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:7569–7574.
34. Shao J, Yamashita H, Qiao L, Friedman JE. Decreased Akt kinase activity and insulin resistance in C57BL/KsJ-Leprdb/db mice. *J Endocrinol* 2000;167:107–115.
35. Stenbit AE, Tsao TS, Li J, Burcelin R, Geenen DL, Factor SM, et al. GLUT4 heterozygous knockout mice develop muscle insulin resistance and diabetes. *Nat Med* 1997;3:1096–1101.
36. Zhou S, Palmeira CM, Wallace KB. Doxorubicin-induced persistent oxidative stress to cardiac myocytes. *Toxicol Lett* 2001;121:151–157.
37. Childs AC, Phaneuf SL, Dirks AJ, Phillips T, Leeuwenburgh C. Doxorubicin treatment in vivo causes cytochrome C release and cardiomyocyte apoptosis, as well as increased mitochondrial efficiency, superoxide dismutase activity, and Bcl-2:Bax ratio. *Cancer Res* 2002;62:4592–4598.
38. Gilliam LA, St Clair DK. Chemotherapy-induced weakness and fatigue in skeletal muscle: the role of oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 2011;15:2543–2563.
39. Smuder AJ, Kavazis AN, Min K, Powers SK. Exercise protects against doxorubicin-induced oxidative stress and proteolysis in skeletal muscle. *J Appl Physiol* (1985) 2011;110:935–942.
40. Davies KJ, Doroshov JH. Redox cycling of anthracyclines by cardiac mitochondria. I. Anthracycline radical formation by NADH dehydrogenase. *J Biol Chem* 1986;261:3060–3067.
41. Weinstein DM, Mihm MJ, Bauer JA. Cardiac peroxynitrite formation and left ventricular dysfunction following doxorubicin treatment in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 2000;294:396–401.
42. Deavall DG, Martin EA, Horner JM, Roberts R. Drug-induced oxidative stress and toxicity. *J Toxicol* 2012;2012:645460.
43. Xu X, Persson HL, Richardson DR. Molecular pharmacology of the interaction of anthracyclines with iron. *Mol Pharmacol* 2005;68:261–271.
44. Chen Q, Vazquez EJ, Moghaddas S, Hoppel CL, Lesnfsky EJ. Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *J Biol Chem* 2003;278:36027–36031.
45. Boden MJ, Brandon AE, Tid-Ang JD, Preston E, Wilks D, Stuart E, et al. Overexpression of manganese superoxide dismutase ameliorates high-fat diet-induced insulin resistance in rat skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2012;303:E798–E805.
46. Jaiswal N, Maurya CK, Pandey J, Rai AK, Tamrakar AK. Fructose-induced ROS generation impairs glucose utilization in L6 skeletal muscle cells. *Free Radic Res* 2015;49:1055–1068.
47. Aoi W, Naito Y, Yoshikawa T. Role of oxidative stress in impaired insulin signaling associated with exercise-induced muscle damage. *Free Radic Biol Med* 2013;65:1265–1272.
48. Pillon NJ, Croze ML, Vella RE, Soulerie L, Lagarde M, Soulerie CO. The lipid peroxidation by-product 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE) induces insulin resistance in skeletal

- muscle through both carbonyl and oxidative stress. *Endocrinology* 2012;**153**:2099–2111.
49. Holmes BF, Sparling DP, Olson AL, Winder WW, Dohm GL. Regulation of muscle GLUT4 enhancer factor and myocyte enhancer factor 2 by AMP-activated protein kinase. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005;**289**:E1071–E1076.
 50. Zheng D, MacLean PS, Pohnert SC, Knight JB, Olson AL, Winder WW, et al. Regulation of muscle GLUT-4 transcription by AMP-activated protein kinase. *J Appl Physiol* (1985) 2001;**91**:1073–1083.
 51. Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, et al. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* 2003;**423**:762–769.
 52. Ruderman NB, Keller C, Richard AM, Saha AK, Luo Z, Xiang X, et al. Interleukin-6 regulation of AMP-activated protein kinase. Potential role in the systemic response to exercise and prevention of the metabolic syndrome. *Diabetes* 2006;**55**:S48–S54.
 53. Carey AL, Steinberg GR, Macaulay SL, Thomas WG, Holmes AG, Ramm G, et al. Interleukin-6 increases insulin-stimulated glucose disposal in humans and glucose uptake and fatty acid oxidation in vitro via AMP-activated protein kinase. *Diabetes* 2006;**55**:2688–2697.
 54. Fearon K, Strasser F, Anker SD, Bosaeus I, Bruera E, Fainsinger RL, et al. Definition and classification of cancer cachexia: an international consensus. *Lancet Oncol* 2011;**12**:489–495.
 55. Sinno MH, Coquerel Q, Boukhattala N, Coeffier M, Gallas S, Terashi M, et al. Chemotherapy-induced anorexia is accompanied by activation of brain pathways signaling dehydration. *Physiol Behav* 2010;**101**:639–648.
 56. Sanchez-Lara K, Ugalde-Morales E, Motola-Kuba D, Green D. Gastrointestinal symptoms and weight loss in cancer patients receiving chemotherapy. *Br J Nutr* 2013;**109**:894–897.
 57. von Haehling S, Morley JE, Coats AJS, Anker SD. Ethical guidelines for Publishing in the Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle: update 2015. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 2015;**6**:315–316.

Received: 8 February 2018 | Accepted: 23 May 2018
 DOI: 10.1002/jcp.26880



ORIGINAL RESEARCH ARTICLE

WILEY *Journal of Cellular Physiology*

Aerobic exercise, but not metformin, prevents reduction of muscular performance by AMPk activation in mice on doxorubicin chemotherapy

Edson A. de Lima Jr.^{1*} | Luís G. O. de Sousa^{2*} | Alexandre Abilio de S. Teixeira¹ |
 Andrea G. Marshall² | Nelo E. Zanchi³ | José C. Rosa Neto¹

¹Immunometabolism Research Group, Department of Cell and Developmental Biology, University of São Paulo, Butantã, São Paulo, Brazil

²Department of Internal Medicine, Division of Endocrinology and Metabolism, University of Iowa, Iowa City, IA

³Laboratory of Cellular and Molecular Biology of Skeletal Muscle (LABCEMME), Department of Physical Education, Federal University of Maranhão (UFMA), São Luís, Maranhão, Brazil

Correspondence

Edson A. de Lima, Jr., Immunometabolism Research Group, Department of Cell and Developmental Biology, University of São Paulo, Avenida Prof Lineu Prestes, 1524, CEP 05508-900, Butantã, São Paulo, Brazil.
 Email: limaea@hotmail.com

Funding information

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Grant/Award Numbers: 2015/17068-2, 2013/09367-4

Doxorubicin (DOX) is a chemotherapy agent widely used in clinical practice, and it is very efficient in tumor suppression, but the use of DOX is limited by a strong association with the development of severe muscle atrophy and cardiotoxicity effects. Reversion or neutralization of the muscular atrophy can lead to a better prognosis. Recent studies have proposed that the negative effect of DOX on skeletal muscle is linked to its inhibition of AMP-activated protein kinase (AMPk), a key mediator of cellular metabolism. On the basis of this, our goal was to evaluate if aerobic exercise or metformin treatment, activators of AMPk, would be able to attenuate the deleterious effects on skeletal muscle induced by the DOX treatment. C57BL6 mice received either saline (control) or DOX (2.5 mg/kg body weight) intraperitoneally, twice a week. The animals on DOX were further divided into groups that received adjuvant treatment in the form of moderate aerobic physical exercise (DOX+T) or metformin gavage (300 mg/body weight/day). Body weight, metabolism, distance run, muscle fiber cross-sectional area (CSA), and protein synthesis and degradation were assessed. We demonstrated that aerobic training, but not metformin, associated with DOX increased the maximal aerobic capacity without changing muscle mass or fiber CSA, rescuing the muscle fatigue observed with DOX treatment alone. This improvement was associated with AMPk activation, thus surpassing the negative effects of DOX on muscle performance and bioenergetics. In conclusion, aerobic exercise increases AMPk activation and improved the skeletal muscle function, reducing the side effects of DOX.

KEYWORDS

aerobic exercise, doxorubicin (DOX), metformin (MET), muscle wasting, skeletal muscle

Abbreviations: AMPk, AMP-activated protein kinase; CSA, cross-sectional area; CT, control; DOX, doxorubicin; GC, gastrocnemius complex; MET, metformin; MPS, muscle protein synthesis; MS, maximal speed run; ROS, reactive oxygen species; T, aerobic training.

*Lima and Sousa contributed equally to this study.

1 | INTRODUCTION

Doxorubicin (DOX) is a chemotherapeutic agent of the anthracycline family widely used as a pharmacological strategy for the treatment of cancer. Currently, cancer is one of the leading causes of death and morbidity in the world (Ferlay et al., 2015; Siegel, Miller, & Jemal, 2015). DOX is widely used, but at less than optimal dosages due to severe side effects (Benjamin, Wiernik, & Bachur, 1974; Biondo et al.,

2016; de Lima et al., 2016; Fahim et al., 2011; Lopes Meisel, Dirnagl, Carvalho, Bastos Mde, 2008; Shi, Moon, Dawood, McManus, & Liu, 2011). One of the main side effects targeted for research in the literature is cardiotoxicity (McGowan et al., 2017; Wang, Song, & Zou, 2012). However, the effects on skeletal muscle contribute to the deterioration in the quality of life and life expectancy of patients and are associated with the physical inability and poorer prognosis (Bredahl & Hydock, 2017; Bye et al., 2017; De Beer, Finkle, Voest, Van Heijst, & Schiereck, 1992; Gorselink et al., 2006; Lowe, Watanabe, Baracos, & Courneya, 2009; van Norren et al., 2009). Thus, the characterization of adjuvant treatments that may mitigate the adverse effects of the chemotherapy treatment is of considerable clinical importance.

A reduction in the AMP-activated protein kinase (AMPk) activity has recently been implicated in the negative side effects of DOX treatment. Moreover, our recent findings showed that DOX treatment induced a significant impairment in glucose uptake by AMPk inhibition (de Lima et al., 2016). Therefore, interventions that increase the AMPk activity may be able to mitigate the negative effects of DOX treatment.

Along these lines, recent studies have pointed to beneficial effects of physical exercise and metformin on the attenuation of cardiotoxicity in combination with DOX (Biondo et al., 2016; de Lima et al., 2016; Gratia et al., 2012; Wang et al., 2012). Both physical exercise and metformin are AMPk activators. AMPk is a heterotrimer protein, composed of a catalytic α subunit and regulatory β and γ subunits (Steinberg & Kemp, 2009), and acts as a sensor of the cellular energy level. It is mainly stimulated by high AMP/ATP and/or ADP/ATP ratios (Oakhill et al., 2011). In muscle, contraction is an important factor for AMPk activation (Carling & Hardie, 1989; Jorgensen et al., 2004). Thus, metabolic changes caused by exercise promote increased AMPk activity, whether by acute (Chen et al., 2003; Fujii et al., 2000) or chronic exercise (Jorgensen et al., 2004; Nielsen et al., 2003). Metformin is an antidiabetic drug (biguanide) that indirectly increases AMPk activation by inhibiting complex I of the mitochondrial respiratory chain (Owen, Doran, & Halestrap, 2000).

The potential additive effect on the inhibition of breast tumor growth is observed when there is an association between physical exercise and DOX (Jones et al., 2005). Since changes in the skeletal muscle of patients due to chemotherapy may cause impairment in patients' quality of life, a growing number of studies have recently sought to investigate the mechanisms responsible for increased catabolism and muscle fatigue (Gilliam & St Clair, 2011; Gilliam et al., 2009; Gilliam et al., 2012). The physical exercise, in turn, has already been shown to be able to reduce the expression of proteins related to proteolysis, such as FoxO1, MuRF-1, BNIP3, and myostatin (Kavazis, Smuder, & Powers, 2014), as well as attenuate muscle dysfunction and fatigue (Bredahl, Pfannenstiel, Quinn, Hayward, & Hydock, 2016).

Some studies investigating metformin have shown that when associated with DOX chemotherapy, it results in greater therapeutic efficacy, such as the observed antitumorigenic effects and reduced

rate of tumor remission (Blandino et al., 2012; El-Ashmawy, Khedr, El-Bahrawy, & Abo Mansour, 2017; Hirsch, Iliopoulos, Tschlis, & Struhl, 2009; Iliopoulos, Hirsch, & Struhl, 2011). However, its effects on lean mass are still obscure. It was only recently that the effect of DOX on diabetic skeletal muscle and its impact on inflammation and metabolism were investigated. Although this model of diabetes does not result in the exacerbation of muscle mass impairment, little is known about the effects of metformin on the processes of muscle catabolism induced by this chemotherapeutic drug (Supriya et al., 2016).

Growing evidence indicates the toxic effect of DOX on skeletal muscle able to generate the disruption in glucose and protein metabolism lead to muscle atrophy. However, the mechanisms and possible treatments for this condition caused by DOX chemotherapy are still unclear. On the basis of this, the objective of our study was to evaluate whether the use of pharmacological strategies (treatment with metformin) and nonpharmacological (aerobic training), which leads to AMPk activation, would be able to attenuate or reverse the loss of lean mass induced by DOX with the focus on balance between degradation and protein synthesis.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Animals

C57BL/6 male mice aged 8–10 weeks were used. The animals were kept in a room with a light–dark cycle of 12–12 hr and at a temperature of $22 \pm 2^\circ\text{C}$, with a normal diet (Nuvital ration of Nuvilab, Colombo, PR, Brazil) and with food and water ad libitum. All the procedures of this study followed the ethical principles of animal experimentation and were submitted to the Committee of Ethics in Animal Experimentation of the University of São Paulo.

Part of these animals received DOX chloridrate (Eurofarma Laboratory, Campinas, Brazil), 2.5 mg/kg body weight, twice a week (DOX), whereas the control group (CT) received the same volume of saline solution. Animals that received DOX were still further divided into groups of animals that performed treadmill exercise (DOX+T) or received metformin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 300 mg/kg of body weight daily by gavage (DOX+MET).

After 6 weeks, mice were fasted for 6 hr and euthanized for the collection of blood and tissue samples. Gastrocnemius (GC) muscle and adipose tissue cushions were weighed and stored for the further analysis of messenger RNA and protein expression.

2.2 | Exercise protocol

All groups performed 1 week of treadmill adaptation, in which they ran at 10 m/min for 5 days, before beginning the treatment protocols. From 6 weeks, the DOX+T group was submitted to an aerobic training protocol, 60 min at 60% of the maximal speed run (MS), 5 days/week. The MS consisted of a warm-up (5 min at 10 m/min) phase and from the sixth minute, the treadmill speed increased

3 m/min until the animals had run mechanical alterations, featuring exhaustion ($n = 13-14$).

2.3 | Serum analysis

Fasting blood glucose was assessed using a colorimetric assay. Serum insulin (Millipore Corp., Bedford, MA), adiponectin (DuoSet ELISA, R&D Systems, Minneapolis, MN), testosterone, and corticosterone (Assay Designs, Inc., Ann Arbor, MI) were quantified using the enzyme-linked immunosorbent assay.

2.4 | Cross-sectional area analysis

This method was adapted from Baehr et al. (2016). Briefly, frozen muscles were cut 10 μm thick from the medial portion of the GC using a Leica CM 3050S cryostat (Leica Microsystems, Nussloch, Germany). To determine fiber cross-sectional area (CSA; μm^2), sections were stained with anti-laminin (1:1,000; Sigma-Aldrich) and visualized using the 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) detection method according to the manual. Laminin images were acquired using a bright field Nikon E1000 microscope (Melville, NY). Gastrocnemius muscle images at 200 \times total magnification were captured using a Nikon DMX1200 digital camera (Nikon Corporation, Melville, NY). For each muscle, four nonoverlapping regions were used, and at least 200 fibers were analyzed per animal. Images were quantified using Image Pro Plus analysis software (Image Pro Plus software, NIH). The same four regions were analyzed across all mice. All analyses were conducted by a single observer blinded to the mouse's identity. Data are reported as means \pm standard error of the mean based on individual animal mean values ($n = 5 - 6$).

2.5 | Enzyme assay

For determination of citrate synthase activity, soleus muscles were lysed using complete protease inhibitor cocktail (Roche) and CellLyticTM MT Cell Lysis Reagent (cat no. C3228; Sigma-Aldrich; $n = 6 - 7$). Citrate synthase activity was assessed using 8 μg protein with the Citrate Synthase Assay Kit (cat no. CS0720; Sigma-Aldrich).

2.6 | Puromycin assay

Protein synthesis was measured using the surface sensing of translation method, as described by Baehr et al. (2016). After dissolving the puromycin (cat. no. 5540222; EMD Millipore, Billerica, MA) in sterile saline, animals received an intraperitoneal (i.p.) injection (0.02 $\mu\text{mol/g}$ body weight) 30 min before starting muscle collections. Thirty minutes after i.p. injection, the gastrocnemius muscle was excised, flash frozen in liquid N_2 , and stored at -80°C . Gastrocnemius was powdered and homogenized in sucrose lysis buffer (50 mM Tris pH 7.5, 250 mM sucrose, 1 mM EDTA [ethylenediaminetetraacetic acid], 1 mM ethylene glycol-bis(β -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid, 1% Triton X 100, and 50 mM NaF). After a 10 min centrifugation at 8,000g, protein concentrations were determined using the Bradford method (Bio-Rad[®], Hercules, CA). Twenty micrograms of protein was separated on 10%

acrylamide gels by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel (SDS-PAGE) and transferred to the nitrocellulose membrane (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). The membrane was stained with Ponceau S and imaged to see total protein. Membranes were washed in 1 \times Tris-buffered saline with 0.1% Tween-20 (TBST) three times (5 min each wash), then blocked in 3% nonfat dairy milk for 1 hr. After a wash, the membranes were then probed with a primary antibody against puromycin (cat. no. MAEBE343; EMD Millipore, Temeluc, CA) overnight at 4°C . After a wash, membranes were incubated with peroxidase-conjugated secondary antibody at the concentration of 1:10,000 for 1 hr at room temperature, washed, and incubated in the Western ECL substrate detection system for 5 min before image acquisition (Clarity TM; Bio-Rad). Image acquisition and band quantification were performed using the AI600 (GE) System and Image StudioTM software version 5 \times .

2.7 | Western blotting

The gastrocnemius muscles were carefully homogenized in the extraction buffer containing protease and phosphatase inhibitors. After proper centrifugations, the proteins were determined by the Bradford assay (Bio-Rad[®], Hercules, CA). Aliquots of each sample with the same concentration of total protein (20–40 μg) were diluted in Laemmli buffer. The samples were then subjected to electrophoresis on SDS-PAGE, transferred to polyvinylidene difluoride membrane, which was incubated first with primary antibodies at a 1:1,000 dilution against phospho-AMPK α Thr172 (cat. no. 2531), AMPK α (cat. no. 2532), pS6 Thr389 (cat. no. 9205), 4EBP1 Thr37/46 (cat. no. 2855), 4EBP1 (cat. no. 4644), Beclin (cat. no. 3495), LC3 β (cat. no. 12741), ATG7 (cat. no. 8558)—all obtained from Cell Signaling Technology (Danvers, MA)—Puromycin (cat. no. MAEBE343; EMD Millipore, Temeluc, CA), and PGC-1 α (cat. no. AB54481; Abcam, Cambridge, MA) and then incubated with an anti-IgG antibody conjugated with a peroxidase-conjugated secondary antibody at a 1:10,000 dilution for 1 hr at room temperature then washed three times per 5 min in TBST. After the incubations and washes, these membranes were incubated with the peroxidase substrate (ECL kit; Bio-Rad[®]) and quantified by optical densitometry. Ponceau S staining was used as a loading control (Gilda & Gomes, 2013; $n = 4-6$).

2.8 | Proteasome activity

The activities of 20S and 26S proteasome were performed using muscle powder from whole gastrocnemius muscle, as previously described by Baehr et al. (2016). The chymotrypsin-like ($\beta 5$) activity assays were carried out in a total volume of 100 μl in 96-well opaque plates. The 26S ATP-dependent assays were performed in a homogenization buffer with the addition of 100 μM ATP. The 20S ATP-independent assays were carried out in the assay buffer containing 25 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES), 0.5 mM EDTA, and 0.001% SDS (pH 7.5). Proteasome activities were determined using 100 μM of Z-Leu-Leu-Glu-7-AMC (Peptide Institute), Boc-Leu-Ser-Thr-Arg-7-AMC (Bachem), or succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-7-amido-4-methylcoumarin (LLVY-AMC; Bachem) for the $\beta 5$ subunit. Each assay was conducted in the absence and presence of the proteasome inhibitor bortezomib at a

TABLE 1 Doxorubicin leads to a severe loss of adipose tissue and skeletal muscle

| | CT | DOX | DOX+MET | DOX+T |
|-------------------------------------|----------------|------------------|------------------|------------------|
| Gastrocnemius (mg) | 303.4 ± 49.42 | 209.7 ± 56.53*** | 202.8 ± 39.56*** | 207.5 ± 35.40*** |
| Subcutaneous adipose tissue (mg) | 207.1 ± 48.03 | 89.25 ± 53.79* | 65.92 ± 41.78* | 89.17 ± 34.77* |
| Epididymal adipose tissue (mg) | 306.1 ± 104.6 | 48 ± 34.46* | 86 ± 118.7* | 37.86 ± 19.68* |
| Retroperitoneal adipose tissue (mg) | 78.15 ± 30.86 | 8.833 ± 12.1* | 3.417 ± 3.94* | 3.667 ± 5.92* |
| Mesenteric adipose tissue (mg) | 426.70 ± 89.98 | 234.60 ± 186.5* | 209.40 ± 74.1* | 235.30 ± 79.36* |
| Brown adipose tissue (mg) | 92.29 ± 37.01 | 81.13 ± 23.2 | 57 ± 37.54 | 68.43 ± 33.61 |

Note. Values represent the mean ± standard deviation of the data obtained from analysis of 8–10 animals per group. CT, control; DOX, doxorubicin; MET, metformin; T, aerobic training.

* $p < 0.05$.

** $p < 0.01$.

*** $p < 0.001$ versus CT.

final concentration of 2 mM. Released AMC was measured by a Synergy™ H1 hybrid Multi-Mode Microplate Reader (Biotek Highland Park, Winooski, VT) at an excitation wavelength of 390 nm and an emission wavelength of 460 nm. Fluorescence was measured at 15 min intervals for 2 hr. The activity of the 20S and 26S proteasome was measured by calculating the difference between fluorescence units recorded with or without the inhibitor in the reaction medium. ($n = 4 - 6$).

2.9 | Quantitative real-time polymerase chain reaction

The expression of skeletal muscle genes was assessed by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) with SYBR Green marker. Total RNA from the gastrocnemius muscle was extracted with Trizol reagent (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA). The complementary DNA (cDNA) was synthesized from 2 µg of total RNA extracted using reverse transcriptase with the High-Capacity cDNA kit (Applied Biosystems, Warrington, UK). RNA was measured by a spectrophotometer at 260 nm, and purity was determined by the ratio 260/280 nm. Gene expression was evaluated by the RT-PCR using a Rotor Gene (Qiagen) and SYBR Green as the fluorescent dye. Quantification was performed using the comparative Ct method. Primer sequences are shown in Supporting Information Table 1 ($n = 6-7$).

2.10 | Statistical methods

The data are presented as mean ± standard deviation and analyzed by one-way analysis of variance, followed by the Bonferroni post test. Analyses were performed using GraphPad Prism 6.0 software. Differences were considered significant when $p < 0.05$.

3 | RESULTS

3.1 | Body weight and food intake

All groups treated with DOX had decreased body weight (Figure 1a), but without change in food intake (Figure 1b), indicating that neither metformin nor aerobic training are able to restore the decreased body weight.

The loss of body weight is due to loss of both fat and lean body mass. The chemotherapy treatment caused extensive reduction of adipose tissue and skeletal muscle. The pharmacological treatment with metformin or exercise did not recovery the weight loss of fat pad (subcutaneous, epididymal, retroperitoneal, and mesenteric) and gastrocnemius muscle caused by DOX (Table 1). There was no change in brown adipose tissue weight (Table 1).

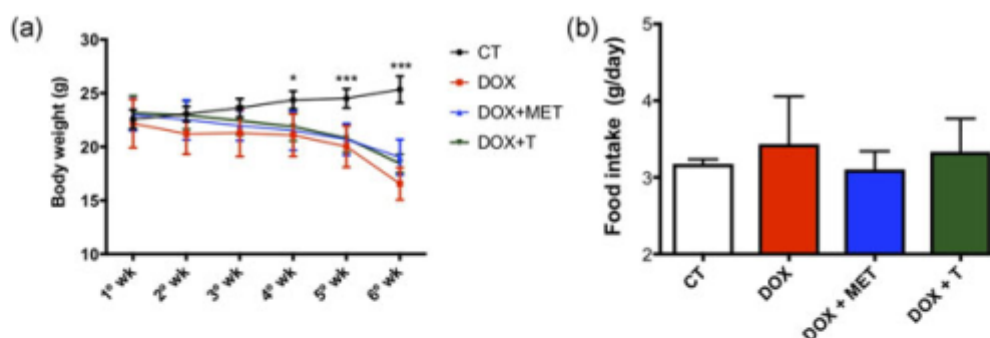


FIGURE 1 Doxorubicin (DOX) treatment decreases body weight. (a) Body weight during treatment (g); (b) food intake during treatment (g). * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$. $n = 7 - 4$. CT, control; MET, metformin; T, aerobic training [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

TABLE 2 Effects of doxorubicin in adipose tissue and serum parameters

| | CT | DOX | DOX+MET | DOX+T |
|---------------------------|---------------|-----------------|------------------|-----------------|
| Glucose (mg/dl) | 129.2 ± 14.89 | 100.2 ± 22.14** | 97.54 ± 20.96*** | 102.3 ± 17.72** |
| Insulin (ng/ml) | 0.63 ± 0.20 | 0.34 ± 0.20 | 0.51 ± 0.22 | 0.60 ± 0.28 |
| Serum adiponectin (ng/ml) | 1,493 ± 1,084 | 2,193 ± 1,185 | 1,330 ± 877.6 | 1,226 ± 567.7 |

Note. Values represent the means ± standard deviation of the data obtained from analysis of 8–12 animals per group. CT, control; DOX, doxorubicin; MET, metformin; T, aerobic training.

** $p < 0.01$.

*** $p < 0.001$ versus CT.

3.2 | Effects on systemic parameters

On the basis of the reductions in adipose tissue weight caused by DOX, we evaluated the concentration of adiponectin in serum. No changes were observed (Table 2). Also, both adipose tissue and skeletal muscle play a key role in insulin-mediated glucose uptake. The chemotherapy decreased basal glycemia, without change in insulin concentration (Table 2). Adjuvant treatments did not alter this condition. The balance between anabolic and catabolic hormones is important in skeletal muscle homeostasis. Therefore, we investigated whether the treatments would cause changes in the circulating concentration of testosterone and

corticosterone. Corticosterone was increased in the DOX group and both treatments groups (metformin and exercise) were able to reduce them (Figure 2a). The testosterone concentration was not altered (Figure 2b).

3.3 | Aerobic running capacity

As expected, the final maximum velocity after 6 weeks of aerobic training increased in the DOX+T group, whereas in the group treated just with DOX, there was a decrease in this physical capacity (Figure 3a). These differences were not observed in the DOX+MET

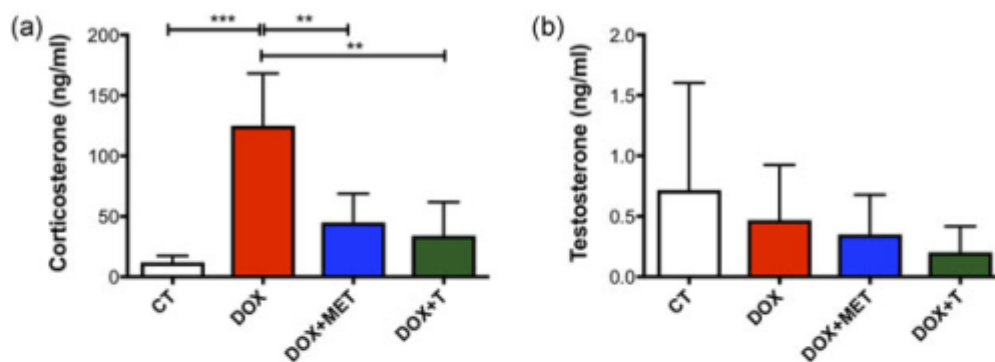


FIGURE 2 Aerobic physical exercise and metformin reduce the effect of doxorubicin on circulating corticosterone. (a) Serum corticosterone ($n = 4 - 5$); (b) serum testosterone ($n = 9 - 10$). ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. CT, control; DOX, doxorubicin; MET, metformin; T, aerobic training [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

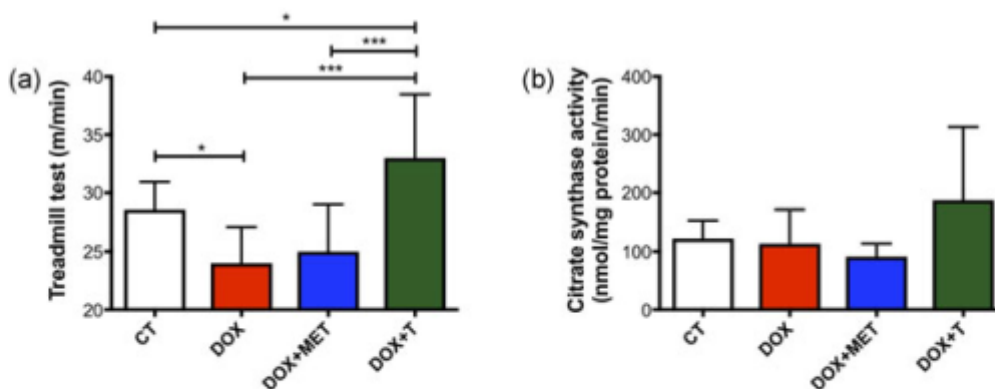


FIGURE 3 Aerobic exercise prevents the reduction of maximum velocity in treadmill test caused by doxorubicin. (a) Final maximum speed at a treadmill test (m/min); (b) citrate synthase activity in gastrocnemius muscle (nmol/mg/protein/min); * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$. CT, control; DOX, doxorubicin; MET, metformin; T, aerobic training [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

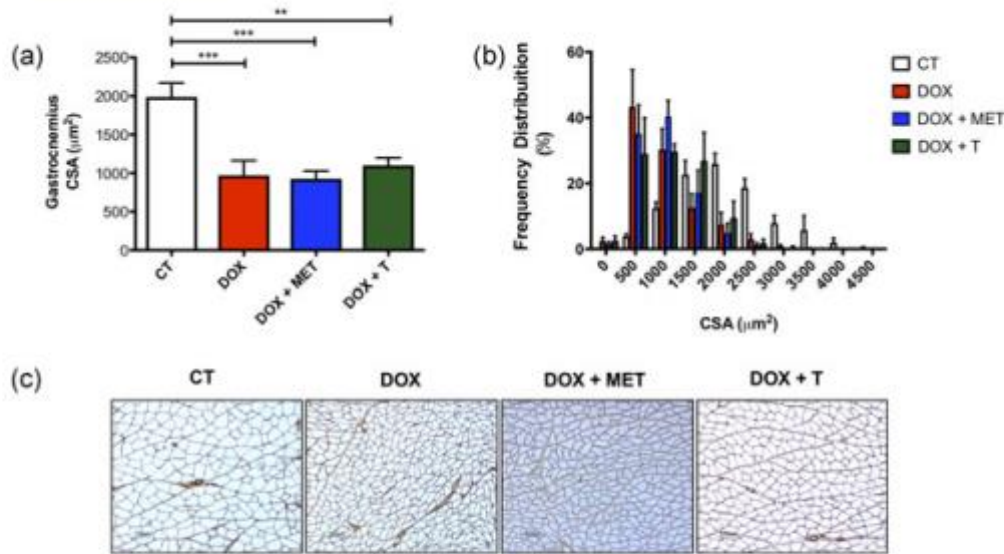


FIGURE 4 Effects on skeletal muscle caused by doxorubicin. (a) Cross-sectional area (μm^2); (b) frequency distribution of mean fiber cross-sectional area; (c) representative histological images. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. CT, control; DOX, doxorubicin; MET, metformin; T, aerobic training [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

group. Furthermore, there was no change in the citrate synthase activity for any group (Figure 3b).

3.4 | Exercise and metformin effects on CSA in skeletal muscle

Exercise and metformin did not recover the loss of CSA in gastrocnemius muscle (Figure 4a–c). As shown in Figure 4a–c, chemotherapy alone causes severe reduction of fiber area.

3.5 | Effects on proteins involved in muscle metabolism

Although PGC1 alpha levels are unaffected by DOX treatment alone, a combination of DOX treatment with either metformin or exercise training significantly reduces PGC-1 alpha levels (Figure 5a). However, another important protein involved in skeletal metabolism was altered. Physical exercise and metformin are both AMPK activators. On the basis of this, we investigated the effect of the interventions. The AMPK α pT172/total AMPK α expression was increased in the DOX+T group (Figure 5b). There was a tendency to increase this protein in the DOX+MET group ($p = 0.069$). Adiponectin is one of the possible activators of AMPK. In this sense, we evaluated the receptor expression of this protein in the skeletal muscle. There was a reduction of gene expression of ADIPOR1 in the DOX+T group compared with the CT group (Figure 5c) without alterations in ADIPOR2 gene expression (Figure 5d).

3.6 | Effects on protein synthesis and its signaling

On the basis of our results demonstrating reduction of muscle mass, we investigated whether protein synthesis could be involved in this process. We observed that protein synthesis is decreased with DOX

treatments (DOX group and DOX+MET), and aerobic exercise rescue this effect (Figure 6a). Then, we investigated possible targets in the protein synthesis signaling pathway that could be involved in this process. We did not observe change in pS6k (Thr389) or p4EBP1 (Thr37/46)/4EBP1 ratio (Figure 6b,c).

3.7 | Effects on protein degradation pathways

Autophagy and proteasomal degradation could be other possible mechanisms that could be involved in muscle wasting previously observed. Thus, we investigated how the treatments could change the proteasomal activity. Treatment with DOX alone does not alter the proteasome activity. However, the DOX+MET group showed increase in the 20S $\beta 5$ activity in comparison with all other groups (Figure 7a). There was no change in 26S $\beta 5$ activity (Figure 7b). MAFbx/atrogen-1, an important protein expressed during muscular atrophy, was not changed either (Figure 7c).

With regard to autophagy, we observed that aerobic exercise and metformin reduces the expression of proteins involved in this process. The expression of autophagic proteins Atg7 and Beclin was reduced by both exercise and metformin (Figure 8b,c), while the protein expression of LC3 β was reduced just for the DOX+T group (Figure 8a). These results are caused by the treatments themselves since there was no statistical difference between the CT and DOX groups.

4 | DISCUSSION

Our findings showed that aerobic exercise associated with DOX treatment increased the maximal aerobic capacity without changing muscle mass or fiber CSA, rescuing the muscle fatigue observed with DOX treatment alone. In adjuvant treatment with metformin, this

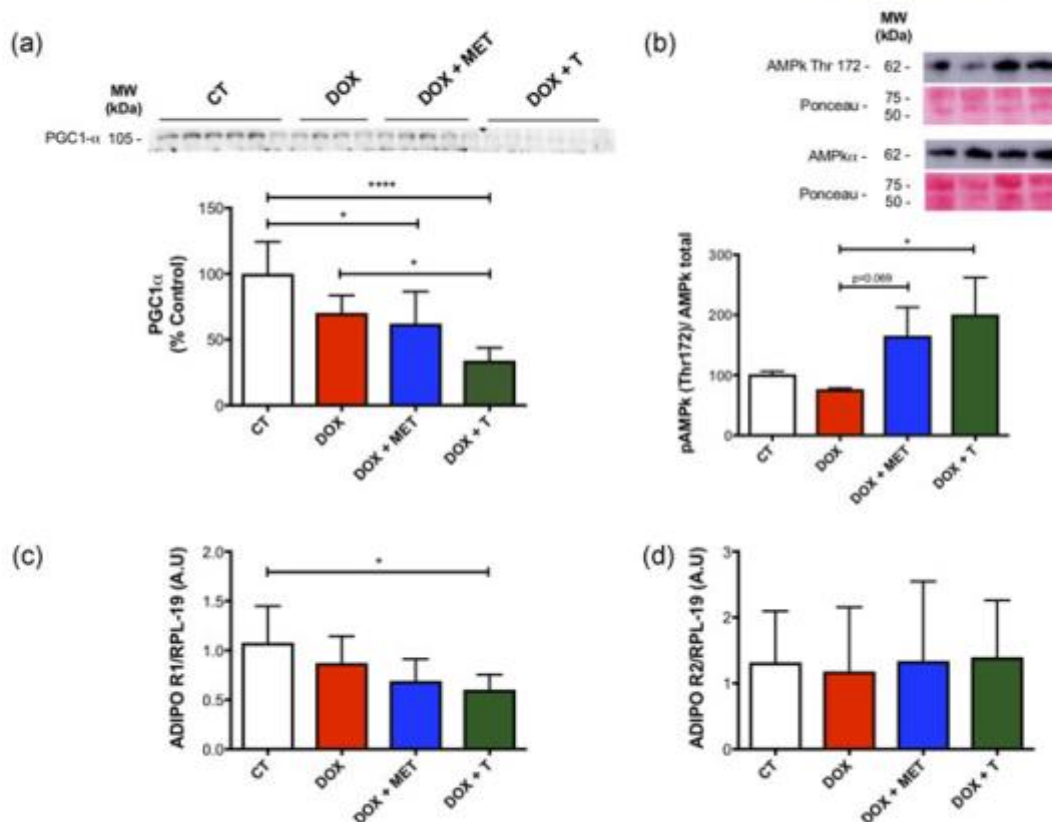


FIGURE 5 Metabolic changes caused by treatments. (a) PGC-1 α expression in gastrocnemius muscle. (b) Representative image of western blot analysis of total AMPK α and AMPK α Thr172 expression in gastrocnemius muscle and its quantification. (c) AdipoR1 gene expression in gastrocnemius muscle; (d) AdipoR2 gene expression in gastrocnemius muscle * $p < 0.5$, **** $p < 0.0001$. AMPK α , AMP-activated protein kinase; CT, control; DOX, doxorubicin; MET, metformin; T, aerobic training [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

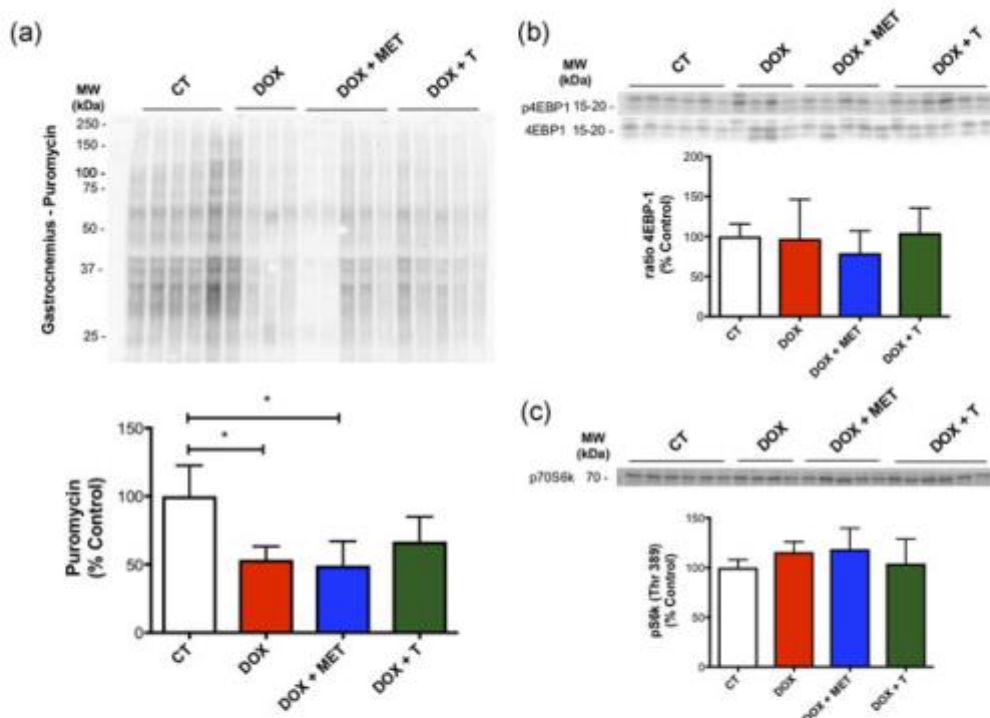


FIGURE 6 Effects of treatments on protein synthesis and its signaling in gastrocnemius muscle. (a) Representative image of western blot analysis using the surface sensing of translation method and protein synthesis in gastrocnemius muscle; (b,c). pS6K (Thr389), 4EBP1 (total and Thr37/46) protein expression and its quantification. * $p < 0.05$. CT, control; DOX, doxorubicin; MET, metformin; T, aerobic training [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

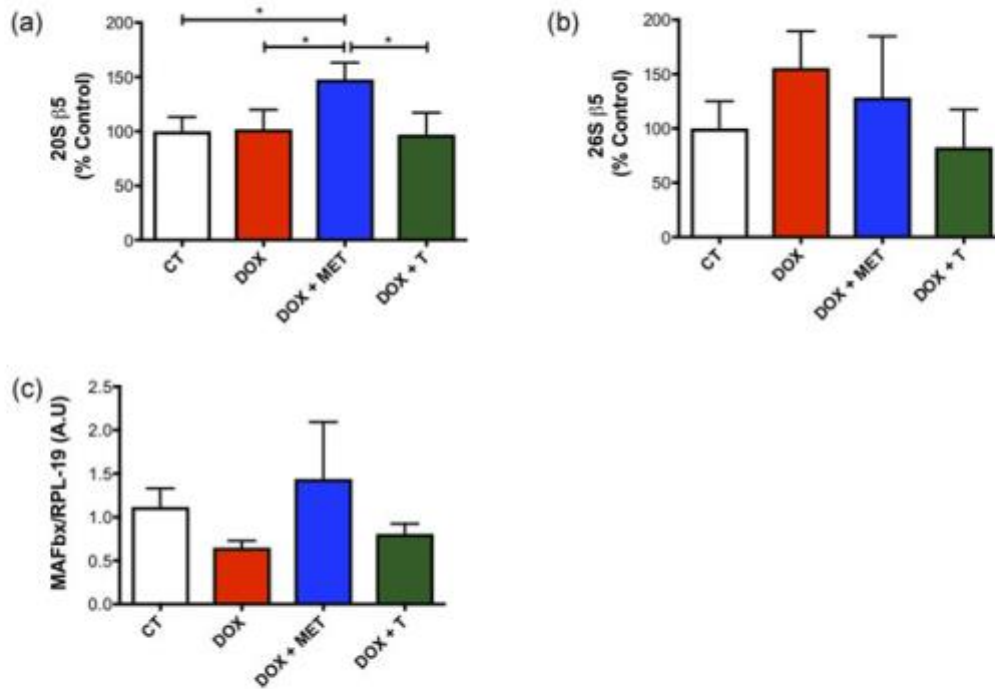


FIGURE 7 Proteasomal activity is increased with association between doxorubicin and metformin. (a) 20S $\beta 5$ activity (ATP independent) in gastrocnemius muscle; (b) 26S $\beta 5$ activity in gastrocnemius muscle (ATP dependent). (c) MAFbx/atrogin-1 gene expression in gastrocnemius muscle. * $p < 0.05$. CT, control; DOX, doxorubicin; MET, metformin; T, aerobic training [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

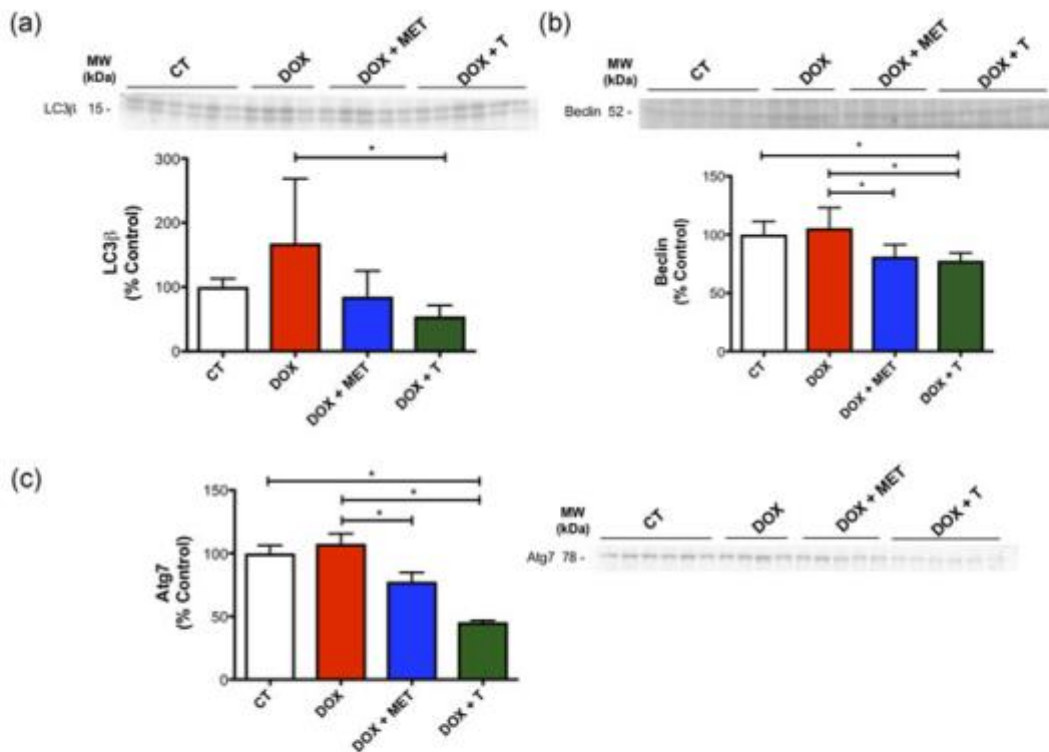


FIGURE 8 Aerobic exercise and metformin reduce the expression of proteins involved in autophagy caused by doxorubicin. (a) LC3 β protein expression in gastrocnemius muscle; (b) Beclin protein expression in gastrocnemius muscle; (c) Atg7 protein expression in gastrocnemius muscle. * $p < 0.05$. $n = 4-6$. CT, control; DOX, doxorubicin; MET, metformin; T, aerobic training [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

was not observed. The improvement caused by exercise was associated with AMPk activation, thus surpassing the negative effects of DOX on muscle performance and bioenergetics.

Our findings showed that the aerobic exercise increased AMPk phosphorylation in comparison with the DOX group in gastrocnemius. Moreover, we observed the improvement in aerobic muscle capacity. However, the CSA, skeletal muscle, and adipose tissue weight were not restored by aerobic exercise after DOX administration. Corticosterone levels increased after DOX treatment, and this effect was counter-regulated by aerobic exercise and metformin. Therefore, the aerobic exercise restored AMPk phosphorylation and improved the aerobic capacity in mice treated with DOX and reduced the autophagic flux, but did not prevent the decrease in CSA and protein synthesis. Although the coadministration with metformin had a few beneficial effects in the group treated with DOX (reducing corticosterone levels and the autophagic pathway induced by DOX), it increased the ubiquitin-proteasome activity and did not prevent muscle loss.

These results suggest that aerobic training could be considered an effective strategy to counteract the negative effects of DOX on AMPk. Considering that AMPk is a master regulator of cell metabolism, an increased expression of genes involved in increased energy metabolism is expected to occur (Hardie, 2014). In this regard, we measured the PGC-1 α protein expression (a transcriptional coactivator that regulates the genes involved in aerobic metabolism), and interestingly, increased AMPk activation was not paralleled by increased PGC-1 α protein expression in gastrocnemius muscle under exercise training. Our training protocol is the moderate (60% maximal velocity), and this model of training was not able to induce an increase in PGC-1 α mRNA (Wen et al., 2014). Moreover, we measured the PGC-1 α protein content in gastrocnemius muscle (a mixed, oxidative, and glycolytic muscle); the lack of molecular adaptation would be the reflex of a muscle specificity, given that oxidative muscles are more susceptible to endurance training effects (Hyatt et al., 2015; Pette, 1985). Although plausible, this is speculative since AMPk activation was robustly increased (even in gastrocnemius muscle).

Muscle metabolism is strictly linked to muscle mass control. Energy deficits frequently lead to muscle loss in several muscle diseases. DOX is a well-known chemotherapeutic drug that induces atrophy and reduces strength (de Lima et al., 2016; Gilliam & St Clair, 2011; van Norren et al., 2009). Skeletal muscle atrophy leads to decreases in muscle performance. In this regard, it was interesting to speculate if AMPk activators, such as metformin or aerobic exercise training, would reverse not only muscle performance but also the negative effects of DOX on muscle mass. We showed that although exercise training rescued muscle performance, the same was not true for muscle mass. This beneficial effect of exercise in muscle performance is similar to the finding of Bredahl et al. (2016), which showed that resistance and aerobic training before the DOX treatment minimized fatigue and preserved skeletal muscle function.

The maintenance of muscle mass is dependent on the ratio of protein synthesis to degradation. The effects of DOX on protein synthesis are controversial and are not well elucidated (Zähringer, 1981; Zima et al.,

2001). Our results indicate that the treatment with DOX reduces protein synthesis, and metformin was not able to rescue this decrease. Aerobic exercise, however, attenuated this effect as the level of protein synthesis in the trained group was intermediate to control and other DOX-treated groups. When observing the effects of both treatments on muscle protein synthesis (MPS), DOX clearly decreased MPS, and this effect was partially reversed by exercise training (but not metformin), although both treatments were ineffective in restoring the muscle loss caused by DOX. It is unclear if increased exercise training (more weeks/sessions) would lead to an antiatrophic effect, but considering the MPS effect, this is a possibility to be considered. Nevertheless, we did not observe an effect on mammalian target of rapamycin (mTOR) downstream signaling (pS6k (Thr389); p4EBP1(Thr37/46):4EBP1 ratio). Recently, Dickinson et al. (2017) showed that chronic DOX administration reduces the mTOR activity via the elevation in REDD1 protein, and the high-intensity chronic exercise mitigates these effects. The conflicting results could be explained by differences in the animal model (Wistar rats vs. Sprague-Dawley rats), the gender (male vs. female ovariectomized), and/or the intensity and type of training between studies.

On the contrary, the DOX-induced protein degradation is well established (Gilliam & St Clair, 2011; Gilliam et al., 2012; Kavazis et al., 2014). Our results showed that the DOX treatment robustly decreased body weight and muscle mass.

In regard to the ubiquitin-proteasome pathway, the skeletal muscle DOX increases protein ubiquitination, leading to an increase in proteasomal activity (Sin et al., 2016). Treatment with DOX activates the FoxO pathway, causing increased expression of proteins involved in proteolysis, like MuRF-1 and atrogin-1/MaFbx (Kavazis et al., 2014). While we did not observe an effect of DOX treatment on this pathway, the association with metformin leads to increased 20S $\beta 5$ proteasome subunit activity. Although the increase in AMPk activation in skeletal muscle can lead to increase in the expression of ubiquitin kinases (Krawiec, Nystrom, Frost, Jefferson, & Lang, 2007), we did not observe an increase in the MAFbx/atrogin-1 mRNA expression.

The autophagic flux was increased by DOX treatment in comparison with adjuvants treatments. Other authors have shown similar results, where DOX treatment increased the expression of autophagic proteins and that exercise can negatively regulate them (Campbell & Quadrilatero, 2016; Smuder, Kavazis, Min, & Powers, 2011). DOX-mediated autophagy is caused by increased mitochondrial uncoupling with the elevation of reactive oxygen species (ROS) production, and the exercise is able to increase antioxidant defense, leading to the reduction in ROS generation (Schwalm et al., 2015; Smuder et al., 2011).

DOX caused increase in corticosterone, as observed in previous studies (de Lima et al., 2016; Kwatra et al., 2016; Preziosi, Vacca, Ragazzoni, del Carmine, & Navarra, 1989). Increased corticosterone levels induce increase in both catabolic pathways (ubiquitin-proteasome and autophagy) in skeletal muscle. Interestingly, exercise training and metformin reversed the increase in corticosterone seen during DOX treatment, but the effects of this reversion on protein metabolism in muscle are not clear, because they were not correlated with glucose

homeostasis improvements (insulin and/or blood glucose) or increase in muscle mass.

Overall, chemotherapeutic agents, such as DOX, are widely utilized in clinical practice, but the negative side effects of such agents impair its use, thus limiting its efficacy. As expected, we observed a robust effect of DOX in decreasing exercise performance and muscle mass, together via a decreased muscle protein synthetic effect. In contrast, aerobic exercise training was capable to restore the exercise capacity, oxidative metabolism via AMPk activation, and hormonal milieu (hypercortisolemia), without affecting muscle mass. Metformin was able to normalize the hypercortisolemia, without major effects on muscle mass or muscle performance. We conclude that moderate-intensity aerobic training, besides safe and effective, is capable of bringing important benefits to counteract DOX metabolic effects in the whole body and skeletal muscle. Those benefits seem to be linked to intrinsic alterations in muscle metabolism, thus bringing alterations to the muscle quality much more than in muscle mass. Finally, only exercise training seems to be capable to bring both metabolic and functional changes to DOX-treated muscle.

ACKNOWLEDGMENT

Research supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo. (FAPESP 2013/09367-4 and 2015/17068-2).

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interests.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

J. C. R. N., E. A. L. Jr., and L. G. O. S. design ed the study; E. A. L. Jr., L. G. O. S., and A. A. S. T. collected and processed the data; J. C. R. N., E. A. L. Jr., L. G. O. S., and N. E. Z. are responsible for data interpretation; and J. C. R. N., E. A. L. Jr., L. G. O. S., A. G. M., and N. E. Z wrote the manuscript.

ORCID

Edson A. Lima  <http://orcid.org/0000-0002-8816-4573>

Luís G. O. Sousa  <http://orcid.org/0000-0003-1013-2595>

Alexandre Abilio S. Teixeira  <http://orcid.org/0000-0002-3099-7070>

Andrea G. Marshall  <http://orcid.org/0000-0001-9997-4478>

Nelo E. Zanchi  <http://orcid.org/0000-0002-2901-3679>

José C. Rosa Neto  <http://orcid.org/0000-0001-7019-9762>

REFERENCES

Baehr, L. M., West, D. W. D., Marcotte, G., Marshall, A. G., De Sousa, L. G., Baar, K., & Bodine, S. C. (2016). Age-related deficits in skeletal muscle recovery following disuse are associated with neuromuscular junction instability and ER stress, not impaired protein synthesis. *Aging*, *8*(1), 127–146.

De Beer, E. L., Finkle, H., Voest, E. E., Van Heijst, B. G. V., & Schiereck, P. (1992). Doxorubicin interacts directly with skinned single skeletal muscle fibres. *European Journal of Pharmacology*, *214*(1), 97–100.

Benjamin, R. S., Wiernik, P. H., & Bachur, N. R. (1974). Adriamycin chemotherapy—Efficacy, safety, and pharmacologic basis of an intermittent single high-dosage schedule. *Cancer*, *33*(1), 19–27.

Biondo, L. A., de Lima, E. A., Jr., Souza, C. O., Cruz, M. M., Cunha, R. D. C., Alonso-Vale, M. I., ... Rosa Neto, J. C. (2016). Impact o. *PLoS One*, *11*(3), e0151548.

Blandino, G., Valerio, M., Cioce, M., Mori, F., Casadei, L., Pulito, C., ... Strano, S. (2012). Metformin elicits anticancer effects through the sequential modulation of DICER and c-MYC. *Nature Communications*, *3*, 865.

Bredahl, E. C., & Hydock, D. S. (2017). Creatine supplementation and doxorubicin-induced skeletal muscle dysfunction: An Ex vivo investigation. *Nutrition and Cancer*, *69*(4), 607–615.

Bredahl, E. C., Pfannenstiel, K. B., Quinn, C. J., Hayward, R., & Hydock, D. S. (2016). Effects of exercise on doxorubicin-induced skeletal muscle dysfunction. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, *48*(8), 1468–1473.

Bye, A., Sjøblom, B., Wentzel-Larsen, T., Grønberg, B. H., Baracos, V. E., Hjerstad, M. J., ... Jordhøy, M. (2017). Muscle mass and association to quality of life in non-small cell lung cancer patients. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*, *8*, 759–767.

Campbell, T. L., & Quadrilatero, J. (2016). Data on skeletal muscle apoptosis, autophagy, and morphology in mice treated with doxorubicin. *Data in Brief*, *7*, 786–793.

Carling, D., & Hardie, D. G. (1989). The substrate and sequence specificity of the AMP-activated protein kinase. Phosphorylation of glycogen synthase and phosphorylase kinase. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1012*(1), 81–86.

Chen, Z. P., Stephens, T. J., Murthy, S., Canny, B. J., Hargreaves, M., Witters, L. A., ... McConell, G. K. (2003). Effect of exercise intensity on skeletal muscle AMPK signaling in humans. *Diabetes*, *52*(9), 2205–2212.

Dickinson, J. M., D'lugos, A. C., Mahmood, T. N., Ormsby, J. C., Salvo, L., Dedmon, W. L., ... Angadi, S. S. (2017). Exercise protects skeletal muscle during chronic doxorubicin administration. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, *49*, 2394–2403.

El-Ashmawy, N. E., Khedr, N. F., El-Bahrawy, H. A., & Abo Mansour, H. E. (2017). Metformin augments doxorubicin cytotoxicity in mammary carcinoma through activation of adenosine monophosphate protein kinase pathway. *Tumour Biology*, *39*(5), 1010428317692235.

Fahim, M. A., Kataya, H., El-Kharrag, R., Amer, D. A., al-Ramadi, B., & Karam, S. M. (2011). Ghrelin attenuates gastrointestinal epithelial damage induced by doxorubicin. *World Journal of Gastroenterology*, *17*(33), 3836–3841.

Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., ... Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, *136*(5), E359–E386.

Fujii, N., Hayashi, T., Hirshman, M. F., Smith, J. T., Habinowski, S. A., Kaijser, L., ... Goodyear, L. J. (2000). Exercise induces isoform-specific increase in 5'AMP-activated protein kinase activity in human skeletal muscle. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *273*(3), 1150–1155.

Gilda, J. E., & Gomes, A. V. (2013). Stain-free total protein staining is a superior loading control to β -actin for Western blots. *Analytical Biochemistry*, *440*(2), 186–188.

Gilliam, L. A., & St Clair, D. K. (2011). Chemotherapy-induced weakness and fatigue in skeletal muscle: The role of oxidative stress. *Antioxidants & Redox Signaling*, *15*(9), 2543–2563.

Gilliam, L. A. A., Ferreira, L. F., Bruton, J. D., Moylan, J. S., Westerblad, H., St. Clair, D. K., & Reid, M. B. (2009). Doxorubicin acts through tumor necrosis factor receptor subtype 1 to cause dysfunction of murine skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology*, *107*(6), 1935–1942.

Gilliam, L. A. A., Moylan, J. S., Patterson, E. W., Smith, J. D., Wilson, A. S., Rabbani, Z., & Reid, M. B. (2012). Doxorubicin acts via mitochondrial ROS to stimulate catabolism in C2C12 myotubes. *American Journal of Physiology Cell Physiology*, *302*(1), C195–C202.

Gorselink, M., Vaessen, S. F., van der Flier, L. G., Leenders, I., Kegler, D., Caldenhoven, E., ... van Helvoort, A. (2006). Mass-dependent decline of skeletal muscle function in cancer cachexia. *Muscle & Nerve*, *33*(5), 691–693.

- Gratia, S., Kay, L., Potenza, L., Seffouh, A., Novel-Chaté, V., Schnebelen, C., ... Tokarska-Schlattner, M. (2012). Inhibition of AMPK signalling by doxorubicin: At the crossroads of the cardiac responses to energetic, oxidative, and genotoxic stress. *Cardiovascular Research*, 95(3), 290–299.
- Hardie, D. G. (2014). AMPK—Sensing energy while talking to other signaling pathways. *Cell Metabolism*, 20(6), 939–952.
- Hirsch, H. A., Iliopoulos, D., Tschlis, P. N., & Struhl, K. (2009). Metformin selectively targets cancer stem cells, and acts together with chemotherapy to block tumor growth and prolong remission. *Cancer Research*, 69(19), 7507–7511.
- Hyatt, H. W., Toedebusch, R. G., Ruegsegger, G., Mobley, C. B., Fox, C. D., McGinnis, G. R., ... Kavazis, A. N. (2015). Comparative adaptations in oxidative and glycolytic muscle fibers in a low voluntary wheel running rat model performing three levels of physical activity. *Physiological Reports*, 3(11), e12619.
- Iliopoulos, D., Hirsch, H. A., & Struhl, K. (2011). Metformin decreases the dose of chemotherapy for prolonging tumor remission in mouse xenografts involving multiple cancer cell types. *Cancer Research*, 71(9), 3196–3201.
- Jones, L. W., Eves, N. D., Courneya, K. S., Chiu, B. K., Baracos, V. E., Hanson, J., ... Mackey, J. R. (2005). Effects of exercise training on antitumor efficacy of doxorubicin in MDA-MB-231 breast cancer xenografts. *Clinical Cancer Research*, 11(18), 6695–6698.
- Jorgensen, S. B., Nielsen, J. N., Birk, J. B., Olsen, G. S., Viollet, B., Andreelli, F., ... Wojtaszewski, J. F. P. (2004). The alpha2-5'AMP-activated protein kinase is a site 2 glycogen synthase kinase in skeletal muscle and is responsive to glucose loading. *Diabetes*, 53(12), 3074–3081.
- Kavazis, A. N., Smuder, A. J., & Powers, S. K. (2014). Effects of short-term endurance exercise training on acute doxorubicin-induced FoxO transcription in cardiac and skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology*, 117(3), 223–230.
- Krawiec, B. J., Nystrom, G. J., Frost, R. A., Jefferson, L. S., & Lang, C. H. (2007). AMP-activated protein kinase agonists increase mRNA content of the muscle-specific ubiquitin ligases MAFbx and MuRF1 in C2C12 cells. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*, 292(6), E1555–E1567.
- Kwatra, M., Jangra, A., Mishra, M., Sharma, Y., Ahmed, S., Ghosh, P., ... Khanam, R. (2016). Naringin and sertraline ameliorate doxorubicin-induced behavioral deficits through modulation of serotonin level and mitochondrial complexes protection pathway in rat hippocampus. *Neurochemical Research*, 41(9), 2352–2366.
- de Lima, E. A., Jr., Yamashita, A. S., Pimentel, G. D., De Sousa, L. G. O., Santos, R. V. T., Gonçalves, C. L., ... Rosa Neto, J. C. (2016). Doxorubicin caused severe hyperglycaemia and insulin resistance, mediated by inhibition in AMPK signalling in skeletal muscle. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*, 7(5), 615–625.
- Lopes, M. A., Meisel, A., Dirnagl, U., Carvalho, F. D., & Bastos Mde, L. (2008). Doxorubicin induces biphasic neurotoxicity to rat cortical neurons. *Neurotoxicology*, 29(2), 286–293.
- Lowe, S. S., Watanabe, S. M., Baracos, V. E., & Courneya, K. S. (2009). Associations between physical activity and quality of life in cancer patients receiving palliative care: A pilot survey. *Journal of Pain and Symptom Management*, 38(5), 785–796.
- McGowan, J. V., Chung, R., Maulik, A., Piotrowska, I., Walker, J. M., & Yellon, D. M. (2017). Anthracycline chemotherapy and cardiotoxicity. *Cardiovascular Drugs and Therapy*, 31(1), 63–75.
- Nielsen, J. N., Mustard, K. J. W., Graham, D. A., Yu, H., MacDonald, C. S., Pilegaard, H., ... Wojtaszewski, J. F. P. (2003). 5'-AMP-activated protein kinase activity and subunit expression in exercise-trained human skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology*, 94(2), 631–641.
- van Norren, K., van Helvoort, A., Argilés, J. M., van Tuijl, S., Arts, K., Gorselink, M., ... van der Beek, E. M. (2009). Direct effects of doxorubicin on skeletal muscle contribute to fatigue. *British Journal of Cancer*, 100(2), 311–314.
- Oakhill, J. S., Steel, R., Chen, Z. P., Scott, J. W., Ling, N., Tam, S., & Kemp, B. E. (2011). AMPK is a direct adenylate charge-regulated protein kinase. *Science*, 332(6036), 1433–1435.
- Owen, M. R., Doran, E., & Halestrap, A. P. (2000). Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. *The Biochemical Journal*, 348(Pt 3), 607–614.
- Pette, D. (1985). Metabolic heterogeneity of muscle fibres. *The Journal of Experimental Biology*, 115, 179–189.
- Preziosi, P., Vacca, M., Ragazzoni, E., del Carmine, R., & Navarra, P. (1989). Stress hormone changes after toxic doses of new anticancer drugs. *Archives of Toxicology*, (Suppl 13), 436–439.
- Schwalm, C., Jamart, C., Benoit, N., Naslain, D., Prémont, C., Prévét, J., ... Francaux, M. (2015). Activation of autophagy in human skeletal muscle is dependent on exercise intensity and AMPK activation. *FASEB Journal*, 29(8), 3515–3526.
- Shi, Y., Moon, M., Dawood, S., McManus, B., & Liu, P. P. (2011). Mechanisms and management of doxorubicin cardiotoxicity. *Herz*, 36(4), 296–305.
- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2015). Cancer statistics, 2015. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 65(1), 5–29.
- Sin, T. K., Tam, B. T., Yu, A. P., Yip, S. P., Yung, B. Y., Chan, L. W., ... Siu, P. M. (2016). Acute treatment of resveratrol alleviates doxorubicin-induced myotoxicity in aged skeletal muscle through SIRT1-dependent mechanisms. *The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences*, 71(6), 730–739.
- Smuder, A. J., Kavazis, A. N., Min, K., & Powers, S. K. (2011). Exercise protects against doxorubicin-induced markers of autophagy signaling in skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology*, 111(4), 1190–1198.
- Steinberg, G. R., & Kemp, B. E. (2009). AMPK in health and disease. *Physiological Reviews*, 89(3), 1025–1078.
- Supriya, R., Tam, B. T., Pei, X. M., Lai, C. W., Chan, L. W., Yung, B. Y., & Siu, P. M. (2016). Doxorubicin induces inflammatory modulation and metabolic dysregulation in diabetic skeletal muscle. *Frontiers in Physiology*, 7, 323.
- Wang, S., Song, P., & Zou, M. H. (2012). Inhibition of AMP-activated protein kinase α (AMPK α) by doxorubicin accentuates genotoxic stress and cell death in mouse embryonic fibroblasts and cardiomyocytes: Role of p53 and SIRT1. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(11), 8001–8012.
- Wen, X., Wu, J., Chang, J. S., Zhang, P., Wang, J., Zhang, Y., ... Zhang, Y. (2014). Effect of exercise intensity on isoform-specific expressions of NT-PCG-1 α mRNA in mouse skeletal muscle. *BioMed Research International*, 2014, 402175.
- Zähringer, J. (1981). The regulation of protein synthesis in heart muscle under normal conditions and in the adriamycin-cardiomyopathy. *Klinische Wochenschrift*, 59(23), 1273–1287.
- Zima, T., Tesar, V., Mantle, D., Koll, M., Patel, V., Richardson, P. J., & Preedy, V. R. (2001). Acute doxorubicin (adriamycin) dosage does not reduce cardiac protein synthesis in vivo, but decreases diaminopeptidase I and proline endopeptidase activities. *Experimental and Molecular Pathology*, 70(2), 154–161.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

How to cite this article: de Lima, Jr. EA, de Sousa LGO, de S. Teixeira AA, Marshall AG, Zanchi NE, Neto JCR. Aerobic exercise, but not metformin, prevents reduction of muscular performance by AMPK activation in mice on doxorubicin chemotherapy. *J Cell Physiol*. 2018;1–11.

<https://doi.org/10.1002/jcp.26880>