



**Maria Margarida
Carmona Freire de
Bastos Loureiro**

**Avaliação do catabolismo muscular no cancro:
papel do exercício físico**



**Maria Margarida
Carmona Freire de
Bastos Loureiro**

Avaliação do catabolismo muscular no cancro: papel do exercício físico

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica Clínica, realizada sob a orientação científica da Doutora Rita Maria Pinho Ferreira, Professora auxiliar convidada do Departamento de Química e da Doutora Ana Isabel Martins Novais Padrão, Investigadora de pós-doutoramento do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

Apoio financeiro da FCT, do Programa Operacional Temático Fatores de Competitividade (COMPETE) E Comparticipado pelo Fundo Comunitário Europeu (FEDER) aos projetos PEst-C/QUI/UI0062/2013, PTDC/DES/114122/2009 e FCOMP-01-0124-FEDER-01477.



QOPNA
UI Química Orgânica, Produtos Naturais e Agro-alimentares

O júri

Presidente

Prof. Doutora Maria do Rosário Gonçalves dos Reis Marques Domingues
Professora Auxiliar do departamento de Química da Universidade de Aveiro

Vogais

Prof. Doutora Rita Maria Pinho Ferreira (orientadora)
Professora Auxiliar Convidada do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof. Doutor José Alberto Ramos Duarte (arguente)
Professor Catedrático da Faculdade de Desporto da Universidade do Porto

Agradecimentos

O desenvolvimento desta Dissertação de Mestrado não seria possível sem o apoio e colaboração de várias pessoas às quais dedicarei o meu mais sincero agradecimento.

Às minhas orientadoras Professora Doutora Rita Maria Pinho Ferreira e Doutora Ana Isabel Martins Novais Padrão pela orientação científica e pelas críticas e sugestões que tanto me ajudaram. Agradeço também a disponibilidade para a leitura crítica do presente relatório.

À Liliana e à Júlia pela amizade, pelo companheirismo no laboratório e na “salinha” e pelos bons momentos que me proporcionam e que tornaram esta fase mais leve e mais descontraída. À Joana Simões, Inês Alves e Sofia Soares pelos “cafés” e momentos de descontração.

Ao Rui Pedro, Fábio e Rita Ferreira pela prontidão e disponibilidade para me ajudarem no laboratório.

Aos meus amigos de sempre e aos que me acompanharam estes 5 anos pela amizade, por compreenderem as minhas ausências e por me apoiarem durante estes meses mesmo nos meus momentos de mau humor. Ao meu namorado, Luís, por ler várias vezes o meu documento sem, no entanto, perceber nada da área e por me apoiar e ajudar em tudo.

Por fim, aos meus pais por me apoiarem em tudo e sem os quais esta etapa não seria possível de alcançar. Aos meus irmãos Belinha e Zeca pela amizade que nos une e pelos momentos de descontração que me proporcionaram ao longo desta fase.

Palavras-chave Caquexia associada ao cancro, citocinas pro-inflamatórias, músculo esquelético, catabolismo muscular esquelético, síntese proteica, proteólise, exercício físico

Resumo A perda excessiva e involuntária de peso corporal associada à perda de massa muscular esquelética, uma síndrome correntemente denominada por caquexia, constitui uma manifestação comum em pacientes com cancro associada a um pior prognóstico. Com o objetivo de melhor perceber a relação tumor-hospedeiro no carcinoma mamário e o impacto do exercício físico na regulação desta interação, no presente estudo avaliou-se a contribuição de vias de sinalização anabólicas e catabólicas na regulação da massa do músculo *gastrocnemius* e relacionou-se com o perfil de mediadores pró-inflamatórios e catabólicos. Para o efeito utilizou-se um modelo animal de rato com carcinoma mamário induzido pela injeção intraperitoneal de uma dose única de 1-metil-1-nitrosureia (MNU). Animais saudáveis e com carcinoma mamário foram submetidos a um programa de exercício físico de reduzida tensão mecânica e longa duração (ERTMLD) em tapete rolante a uma velocidade de 20m/min, 1h/dia, 5dias/semana durante 35 semanas. No final do protocolo verificou-se que cerca de 60% dos animais com carcinoma mamário apresentaram uma perda de peso corporal maior ou igual a 5% associada a uma diminuição superior ou igual a 9% de massa de *gastrocnemius*. Estes animais apresentaram ainda níveis elevados de marcadores inflamatórios e catabólicos que a nível muscular se refletiram num aumento significativo dos níveis da citocina catabólica miostatina e da proteólise mediada pela E3 ligase atrogina-1. A prática de ERTMLD ao longo da vida promoveu nos animais com tumores mamários uma atenuação do perfil sérico inflamatório e a nível do músculo *gastrocnemius* observou-se um aumento significativo da expressão de mTOR que parece justificar, pelo menos em parte, o aumento de massa muscular e de peso corporal observado nestes animais. Em conclusão, a prática de exercício físico de reduzida tensão mecânica e longa duração parece constituir uma abordagem terapêutica não farmacológica eficaz para regular a resposta tumor-hospedeiro e assim prevenir, pelo menos parcialmente, a caquexia associada ao cancro.

Keywords

Cancer cachexia, pro-inflammatory cytokines, skeletal muscle, skeletal muscle wasting protein synthesis, proteolysis, physical exercise

Abstract

Excessive and involuntary weight loss related to the decrease of skeletal muscle mass, a syndrome known as cachexia, is a common manifestation in cancer patients being related to a poor disease prognosis. Aiming to better understand tumor-host interplay in mammary carcinoma and the impact of exercise training on its regulation, in the present study we evaluate the contribution of anabolic and catabolic signaling pathways to the regulation of gastrocnemius muscle mass and related it with the serum profile of pro-inflammatory and catabolic markers. To fulfill this, an animal model of mammary carcinoma induced by a single intraperitoneal injection of 1-methyl-3-nitrosourea (MNU) was used. Healthy animals and ones with mammary tumors were submitted to a training program in a treadmill at a speed of 20m/min, 1h/day, 5days/week for 35 weeks. At the end of the protocol 60% of the animals with mammary tumors showed a weight loss higher or equal than 5%, which was related to a decrease of *gastrocnemius* mass higher or equal than 9%. These animals presented higher levels of serum inflammatory and catabolic markers than healthy ones that were related to a significant increase of myostatin and of the E3 ligase atrogin-1 content in the *gastrocnemius*. Lifelong exercise training prevented the marked serum inflammatory profile noticed in animals with mammary tumors, which was associated to a significant increase of mTOR content at *gastrocnemius* justifying, at least in part, the increase of its mass and of body weight. Taken together, lifelong endurance training seems an attractive non-pharmacological therapeutic approach to positively modulate tumor-host interplay, preventing, at least in part, cancer cachexia.

Índice

Lista de Figuras.....	III
Lista de Tabelas	VII
Nomenclatura.....	IX
Introdução	1
Revisão da Literatura	3
1. Caquexia associada ao cancro	3
1.1 Interação entre o tumor e o hospedeiro	5
1.1.1 Mediadores humorais e tumorais associados à caquexia.....	5
1.2 Regulação da massa muscular esquelética.....	8
1.2.1 Vias de sinalização subjacentes ao controlo da massa muscular.....	9
1.3 Impacto do exercício físico na caquexia associada ao cancro	20
Objetivos.....	25
Material & Métodos.....	27
1. Reagentes	27
2. Procedimento Experimental	28
4. Análise de parâmetros bioquímicos no soro	29
5. Preparação de extratos de músculo <i>gastrocnemius</i>	29
6. Determinação da concentração de proteína total.....	30
7. Análise da expressão proteica por <i>imunoblotting</i>	30
8. Avaliação da atividade proteolítica através de zimografia.....	31

9. Análise Estatística	32
Resultados	33
1. Caracterização da resposta dos animais à administração de MNU e/ou à prática de ERTMLD	33
2. Avaliação do perfil metabólico muscular esquelético em resposta à administração de MNU e/ou à prática de ERTMLD	36
3. Avaliação do catabolismo muscular em resposta à administração de MNU e/ou à prática de ERTMLD.....	37
3.1. Via da miostatina	38
3.2. Via da TWEAK	39
3.3. Via da ubiquitina/proteassoma.....	40
4. Impacto da administração de MNU e/ou da prática de ERTMLD na síntese proteica no músculo esquelético	41
Discussão	43
Conclusões	51
Bibliografia	53

Lista de Figuras

- Figura 1- Influência dos mediadores pro-inflamatórios associados ao tumor no tecido adiposo, muscular esquelético e hepático bem como o seu resultado em termos de perda de peso corporal (adaptado de [1,11]). 6
- Figura 2- Ação dos mediadores catabólicos PIF, TNF- α e IL-6 na síntese e degradação proteica. O PIF é responsável pelo catabolismo muscular e pode atuar através da via NF-kB, com consequente ativação da UPP. Também pode induzir a ativação da apoptose (adaptado de [4]). 7
- Figura 3- Principais vias de sinalização responsáveis pela regulação e controlo da massa muscular esquelética. A IGF-1 ativa a via PI3K-Akt-mTOR que é responsável pelo aumento da síntese de proteínas musculares e pela inibição da sua degradação; Citocinas pró- inflamatórias como o TNF- α promovem um aumento da expressão de enzimas do sistema ubiquitina-proteassoma (UPP) responsável pela degradação proteica. A miostatina, por sua vez, ativa a proteólise via inibição da expressão/atividade da MyoD (adaptado de [16])...... 10
- Figura 4- Mecanismos intracelulares subjacentes à proteólise muscular, dando particular ênfase ao sistema UPP. Neste processo intervêm os sistemas enzimáticos E1, E2 e E3 que promovem a ligação da ubiquitina à proteína a ser degradada pelo proteassoma 26S (adaptado de [16]). 13
- Figura 5- Ativação dos fatores de transcrição NF-kB pela TWEAK. A ligação da TWEAK ao recetor Fn14 promove a ativação de uma série de proteínas sinalizadoras como é o caso da TRAF6, NF-kB, IKK e MAPK (adaptado de [21,35]). 14
- Figura 6- Ação da miostatina na regulação da massa muscular esquelética. A ligação da miostatina ao recetor ActRIIB promove a fosforilação de ALK-4 e ALK-5; estes por sua vez fosforilam Smad2 e 3 que formam um complexo com a Smad4 que é

translocado para o núcleo onde regula a expressão de genes alvo envolvidos na atrofia muscular (adaptado de [36])...... 16

Figura 7- Papel do fator de crescimento IGF-1 na ativação da via PI3K-Akt-mTOR que resulta no aumento de síntese proteica e na inibição da degradação proteica por regulação negativa dos atrogenes MuRF1 e MAFbx (adaptado de [40])...... 18

Figura 8- Apoptose no músculo esquelético. Esta pode ser iniciada através de eventos localizados na mitocôndria, recetores de morte celular, retículo sarcoplasmático e/ou núcleo. Uma vez iniciada pode resultar na ativação de enzimas proteolíticas (caspases e calpaínas) ou de eventos independentes da ativação das caspases, culminando na fragmentação do DNA e destruição de proteínas miofibrilares. A caspase-3 está envolvida na apoptose muscular e na ativação de vias proteolíticas com consequente aumento da degradação de proteínas musculares (adaptado de [31,41])... 19

Figura 9- Mecanismos moleculares que medeiam a síntese e degradação proteica subjacente à caquexia associada ao cancro e o papel do exercício físico na regulação dos mesmos e consequentemente na modulação da área de seção transversal da fibra. A prática de exercício físico de endurance (ERTMLD) modula negativamente a inflamação crónica associada ao tumor, a produção de ROS, a via da ubiquitina/proteassoma e a apoptose. O exercício de resistência (EETMCD) ativa a via hipertrófica Akt/mTOR e modula negativamente a apoptose, com consequente aumento da área de seção transversal da fibra muscular (adaptado de [28]). 24

Figura 10- Esquema da metodologia experimental adotada no presente estudo. 28

Figura 11- Efeito do MNU e/ou do ERTMLD na expressão dos parâmetros séricos miostatina (A), TWEAK (B) e IL-6 (C) avaliada por *slot blot*. Imagens representativas dos imunoblots são apresentadas abaixo dos respetivos gráficos..... 36

Figura 12- Efeito da administração de MNU e/ou do ERTMLD na expressão da subunidade beta de ATP sintase (A), de GAPDH (B) do músculo *gastrocnemius* avaliada por *western blotting*, e da razão ATP sintase/GAPDH (C). Imagens representativas dos imunoblots são apresentadas abaixo dos respetivos gráficos..... 37

Figura 13- Efeito da administração de MNU e/ou da prática de exercício físico na atividade proteolítica muscular esquelética. Abaixo do gráfico é apresentada uma imagem representativa da banda (de ~60kDa) com atividade detetada no gel de zimografia..... 38

- Figura 14- Efeito da administração de MNU e/ou da prática de ERTMLD na expressão de miostatina (A), de p38 MAPK (B) e de p-Smad3 (C) avaliada por *western blotting* no músculo *gastrocnemius*. Imagens representativas dos imunoblots obtidos são apresentadas abaixo dos gráficos..... 39
- Figura 15- Efeito da administração de MNU e/ou da prática de ERTMLD na expressão de TWEAK (A), de p50 (B) e de p65 (C) avaliada por *western blotting* no músculo *gastrocnemius*. Imagens representativas dos imunoblots obtidos são apresentadas abaixo dos gráficos..... 40
- Figura 16- Efeito da administração de MNU e/ou da prática de ERTMLD na expressão de MuRF-1 (A), de atrogina-1 (B) e de TRAF6 (C) avaliada por *western blotting* no músculo *gastrocnemius*. Imagens representativas dos imunoblots obtidos são apresentadas abaixo dos gráficos..... 41
- Figura 17- Efeito da administração de MNU e/ou da prática de ERTMLD na expressão de mTOR (A) e de Akt (B) avaliada por *western blotting* no músculo *gastrocnemius*. Imagens representativas dos imunoblots obtidos são apresentadas abaixo dos gráficos..... 42
- Figura 18- Esquema integrativo das vias moduladas e alterações metabólicas promovidas pela administração de MNU e/ou da prática de ERTMLD e o seu resultado em termos de regulação da massa do músculo *gastrocnemius*. As proteínas assinaladas com duas setas (↑↑) são as que se encontraram significativamente aumentadas no grupo MNU e com uma seta apenas (↑) estão assinaladas as proteínas em que se observou um aumento da expressão embora sem significado estatístico..... 49

Lista de Tabelas

Tabela 1- Caracterização dos animais dos diferentes grupos em termos de peso corporal, da massa do músculo *gastrocnemius* bem como do rácio massa de *gastrocnemius*/peso corporal. 34

Tabela 2- Efeito da administração de MNU e/ou da prática de exercício de RTMLD no perfil bioquímico do soro dos animais em estudo. 35

Nomenclatura

- AIF- Fator indutor de apoptose (do inglês *apoptosis-inducing factor*)
- Akt ou PKB- Cinase serina/treonina (do inglês *serine/treonine kinase*) ou Proteína cinase B (do inglês *protein kinase B*)
- Apaf-1- Fator ativador de protease apoptótica 1 (do inglês *apoptotic protease-activating factor*)
- CRP- Proteína C reativa (do inglês *C-reactive protein*)
- CRF2R- Recetor do fator libertador de corticotropina 2 (do inglês *corticotropin releasing factor 2 receptor*)
- EETMCD- Exercício de elevada tensão mecânica e curta duração
- ERTMLD- Exercício de reduzida tensão mecânica e longa duração
- 4E-BP1- Proteína de ligação 4E-1 (do inglês *4E-binding protein 1*)
- eIF-2B- Fator de iniciação 2B eucariótico (do inglês *eukaryotic initiation factor 2B*)
- GSK3- β - Cinase glicogénio sintase β (do inglês *glycogen synthase kinase- β*)
- GDF-8- Fator de crescimento e diferenciação-8 (do inglês *growth and differentiation factor-8*)
- GPx- Glutationa peroxidase (do inglês *glutathione peroxidase*)
- GSH- Glutationa (do inglês *glutathione*)
- IGF-1- Fator de crescimento semelhante à insulina 1 (do inglês *insulin-like growth factor 1*)
- IL- Interleucina (do inglês *interleukin*)
- INF- γ - Interferão γ (do inglês *interferon- γ*)
- IRS-1- Substrato do recetor de insulina 1 (do inglês *insulin receptor substrate-1*)
- LMF- Fator mobilizador de lipídios (do inglês *lipid mobilizing factor*)
- MAFbx- “*Muscle atrophy F-box*”

MNU- 1-metil-1-nitrosureia

mTOR - Alvo da rapamicina nos mamíferos (do inglês *mammalian Target of rapamycin*)

MuRF1- "*Muscle ringe finger 1*"

PDK-1- Cinase 1 dependente de fosfoinositol (do inglês *phosphoinositide-dependent kinase-1*)

PIF- Fator indutor de proteólise (do inglês *proteolysis-inducing factor*)

PI3K- Inositol-3 fosfato cinase (do inglês *phosphoinositol-3-kinase*)

p70S6K- Cinase S6 ribossomal p70 (do inglês *ribosomal p70 S6 kinase*)

SOD- Superóxido dismutase (do inglês *superoxide dismutase*)

TGF- β - Fator de crescimento de transformação β (do inglês *transforming growth factor- β*)

TNF- α - Fator de necrose tumoral α (do inglês *tumour necrosis factor- α*)

UPP- Via da ubiquitina- proteassoma (do inglês *Ubiquitin-Proteasome Pathway*)

Introdução

A caquexia é um fenómeno que tem sido largamente estudado por estar associado a várias condições patológicas malignas e debilitantes, das quais se destaca o cancro. A caquexia associada ao cancro é uma síndrome complexa, secundária à presença e crescimento do tumor caracterizada, essencialmente, por anorexia, astenia, anemia, resistência à insulina e, ainda, por alterações metabólicas e pelo comprometimento da função imunológica, sendo responsável pela perda de peso involuntária e excessiva, superior ou igual a 5% num período inferior ou igual a 12 meses. A caquexia associada ao cancro caracteriza-se por uma resposta inflamatória crónica envolvendo citocinas pró-inflamatórias e fatores pró-caquéticos que promovem alterações neuroendócrinas (anorexia), aumento da lipólise nos adipócitos e induzem uma resposta hepática de fase aguda que resulta na desregulação, a nível muscular, das vias de sinalização que regulam a síntese/degradação de proteínas [1,2,3,4,5,6,7,8,9].

De entre os tecidos envolvidos, o tecido muscular esquelético é dos mais afetados nesta síndrome paraneoplásica. Este é um tecido dinâmico na medida em que hipertrofia ou atrofia em resposta a estímulos externos que modulam as vias de síntese e degradação proteica [2,21,22,23]. Em resposta aos mediadores químicos induzidos pelo tumor e/ou ao stress oxidativo decorrente de alterações nutricionais, da ativação não específica do sistema imune e/ou da diminuição da atividade dos sistemas antioxidantes, ocorre uma diminuição do conteúdo proteico muscular, da área de seção transversal das fibras bem como da capacidade de produção de energia, culminando em atrofia e perda de função muscular [2,6,13,26,27,28]. Na caquexia associada ao cancro as vias

proteolíticas da ubiquitina/proteassoma, da miostatina bem como da TWEAK parecem estar sobre-estimuladas no músculo esquelético, enquanto a via hipertrófica Akt/mTOR parece estar reprimida. A apoptose parece ter também um papel fundamental na atrofia muscular esquelética, um processo mediado pela fragmentação do DNA e degradação de substratos miofibrilares pelo proteassoma [50].

De entre as abordagens terapêuticas não farmacológicas, o exercício físico praticado de forma regular afigura-se como uma estratégia com potencial aplicação na prevenção e/ou tratamento da atrofia muscular característica da caquexia associada ao cancro, atendendo ao seu potencial papel anabólico no músculo esquelético [28]. O exercício físico tanto de reduzida tensão mecânica e de longa duração (ERTMLD), usualmente designado de exercício de endurance, como o exercício de elevada tensão mecânica e de curta duração (EETMCD), geralmente designado de exercício de resistência, têm a capacidade de preservar a massa muscular, atuando, no entanto, de formas diferentes. Enquanto o exercício de RTMLD (ou de endurance) promove o aumento de citocinas anti-inflamatórias e da atividade antioxidante com conseqüente inibição da produção de espécies reativas de oxigénio (ROS), o exercício de ETMCD (ou de resistência) promove a ativação da via hipertrófica Akt/mTOR com concomitante aumento da síntese proteica [13,27,28,46,47]. Adicionalmente, o exercício físico desempenha um papel fundamental na regulação da apoptose da fibra muscular esquelética por alteração da expressão de proteínas associadas à apoptose, por aumento do número e função das mitocôndrias e do *status* antioxidante e diminuição da produção de ROS [41].

Revisão da Literatura

1. Caquexia associada ao cancro

A caquexia é uma síndrome paraneoplásica complexa e multifatorial caracterizada, essencialmente, por fenómenos como a anorexia, astenia e anemia, alterações no metabolismo dos lípidos, hidratos de carbono e proteínas e diminuição da função imunológica responsáveis pela perda de peso involuntária e excessiva (superior ou igual a 5% do peso corporal num período inferior ou igual a 12 meses). Esta perda de massa corporal ocorre à custa da depleção do tecido muscular esquelético e do tecido adiposo subcutâneo [1,2,3,4,5,6,7]. A caquexia constitui uma manifestação comum em pacientes com doença maligna e pensa-se ser inversamente proporcional ao tempo de sobrevivência do paciente, estimando-se ser responsável por cerca de 25 a 30% dos óbitos por cancro [2,5,8]. A anorexia caracteriza-se por falta de apetite que resulta na diminuição da ingestão de alimentos com consequente perda de peso e, apesar de ser um sintoma de caquexia, esta é reversível mediante um retorno à dieta normal, o que não se verifica na caquexia. A leptina é uma hormona responsável por regular a massa do tecido adiposo e reduzir o apetite. Quando os níveis de leptina são elevados ocorre uma reposta compensatória mediada pelo aumento da produção de agentes orexigénicos, como a grelina e o neuropeptídeo Y. Várias citocinas pro-inflamatórias têm a capacidade de mimetizar a sinalização da leptina e de suprimir a sinalização da grelina e do neuropeptídeo Y. Assim, doenças como o cancro que promovem a produção de

citocinas que mimetizam a resposta hipotalâmica ao excesso de leptina, parecem estar invariavelmente associadas ao desenvolvimento de anorexia e caquexia [9].

A incidência da caquexia é maior em alguns tipos de cancro tais como os cancros gástrico e pancreático (cerca de 83-87%), do pulmão, da próstata, coloretal e da cabeça e pescoço (cerca de 48-61%), embora se manifeste em outros tipos de cancro como o da mama (cerca de 31-40%) [5,10,11]. Sendo a caquexia um processo complexo, foi proposto um critério que prevê quatro estadios de caquexia: ligeira, moderada, severa e terminal. Este sistema de classificação permite avaliar o quão avançada se encontra a caquexia e qual o tratamento mais adequado [1]. Numa primeira fase da doença os pacientes apresentam perda de peso pouco acentuada, no entanto, com a progressão da mesma para estadios mais avançados, ocorre depleção de reservas energéticas (tecido adiposo), catabolismo muscular esquelético acentuado e imunossupressão podendo culminar na morte do paciente, que ocorre no estadio terminal [1,5]. A caquexia afeta a qualidade de vida do doente oncológico uma vez que as alterações físicas características para além de incapacitantes, interferem com o estado emocional e social do paciente [5].

No sentido de permitir o diagnóstico precoce de caquexia e a rápida intervenção terapêutica de modo a reduzir a morbilidade associada a esta síndrome, têm sido propostos alguns biomarcadores. O aumento dos níveis séricos da proteína de fase aguda Proteína C-reativa (CRP), um marcador de inflamação sistémica e de hipermetabolismo, tem sido associado à perda de massa muscular pelo que pode ser considerado um potencial biomarcador da caquexia associada ao cancro. As citocinas pro-inflamatórias TNF- α , IL-1, IL-6 e INF- γ , quando em níveis elevados no plasma sugerem a ocorrência de inflamação induzida pelo tumor. No entanto, estes marcadores não são específicos de caquexia. A angiotensina II parece estar associada ao catabolismo e perda de massa muscular pelo que pode constituir um marcador de caquexia. Os péptidos envolvidos no controlo do apetite como a grelina e a leptina também têm sido sugeridos como marcadores de caquexia. Níveis elevados de lactato no plasma estão comumente presentes em pacientes com cancro mas podem estar também relacionados com outros estados catabólicos [1,5].

1.1 Interação entre o tumor e o hospedeiro

1.1.1 Mediadores humorais e tumorais associados à caquexia

Vários mediadores químicos são responsáveis pelas alterações metabólicas e imunes associadas à caquexia, nomeadamente mediadores humorais produzidos pelo hospedeiro em resposta à presença e proliferação do tumor e mediadores específicos tumorais. As citocinas, produzidas pelas células inflamatórias parecem constituir mediadores humorais com um papel fulcral no fenómeno de caquexia associada ao cancro [2,4,12]. O fator de necrose tumoral α (TNF- α), a interleucina 1 (IL-1), a IL-6 e o interferão γ (IFN- γ) são secretados por células inflamatórias do hospedeiro em resposta à infeção, dano celular ou produção de espécies reativas de oxigénio (ROS) bem como a estímulos pró-inflamatórios do próprio tumor [7,8,9,11,13]. Estes atuam de forma sinérgica uma vez que o TNF- α induz a secreção de IL-1 e esta, por sua vez, estimula a expressão de uma série de outras citocinas incluindo a IL-6 desencadeando uma cascata de eventos que culmina na síntese hepática de proteínas de fase aguda [2,4,11,12,14,15]. Em resposta à IL-6 o fígado sintetiza proteínas de fase aguda, maioritariamente CRP e fibrinogénio. Contrariamente, as concentrações plasmáticas de albumina diminuem em pacientes com caquexia associada ao cancro [7,11,12]. Sabe-se que o aumento dos níveis de CRP em pacientes com doenças malignas está diretamente relacionado com a perda de peso corporal, hipermetabolismo e anorexia, e diminuição da sobrevida [5,16,17]. O mecanismo pelo qual isto acontece ainda permanece desconhecido. Tem sido sugerido que a depleção da reserva de aminoácidos provocada pela excessiva síntese de proteínas de fase aguda contribui para a perda da massa muscular [17]. A perda progressiva de peso corporal associada à caquexia deve-se, em parte, à depleção de massa gorda que resulta da diminuição da ingestão de alimentos bem como da inibição da lipogénese e estimulação da lipólise induzida pelos mediadores pró-inflamatórios. Estudos demonstraram que citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α são capazes de inibir a lipogénese por supressão de fatores de transcrição essenciais à diferenciação de adipócitos. A lipoproteína lípase (LPL) é responsável pela hidrólise dos ácidos gordos das lipoproteínas plasmáticas para que sejam transportados para os adipócitos onde vão servir para a síntese de triacilglicerídeos. As citocinas TNF- α , INF- γ , INF- α , IL-6 e IL-1 parecem inibir a atividade desta enzima, evitando o armazenamento dos ácidos gordos nos adipócitos [3,7,11,18]. Mais ainda, o fator TNF- α parece ser responsável pela indução da expressão

de genes que codificam proteínas do sistema ubiquitina-proteassoma (UPP), envolvido na degradação de proteínas miofibrilares (figura 1). No entanto, esta citocina parece ser apenas um facilitador da atrofia muscular uma vez que a ativação do sistema UPP necessita da conjugação do TNF- α com outros mediadores pro-inflamatórios. A expressão de IL-6 quando induzida pelo tumor parece estar invariavelmente associada à perda de peso e a mau prognóstico em pacientes oncológicos. Apesar de evidências do seu papel na mobilização lipídica e no *turnover* de proteínas miofibrilares, a IL-6 parece estar diretamente relacionada com a resposta de fase aguda. Ao nível das fibras musculares esta citocina ao interagir com o seu recetor (IL6R) promove o aumento da proteólise muscular, apesar do seu envolvimento na ativação da via UPP ser controverso (figura 1) [7]. Efetivamente, verificou-se que a administração de anticorpos anti-IL-6 exerce pouco efeito na perda de massa corporal associada ao cancro, apesar de melhorar alguns sintomas como anorexia, fadiga e/ou anemia [2,7].

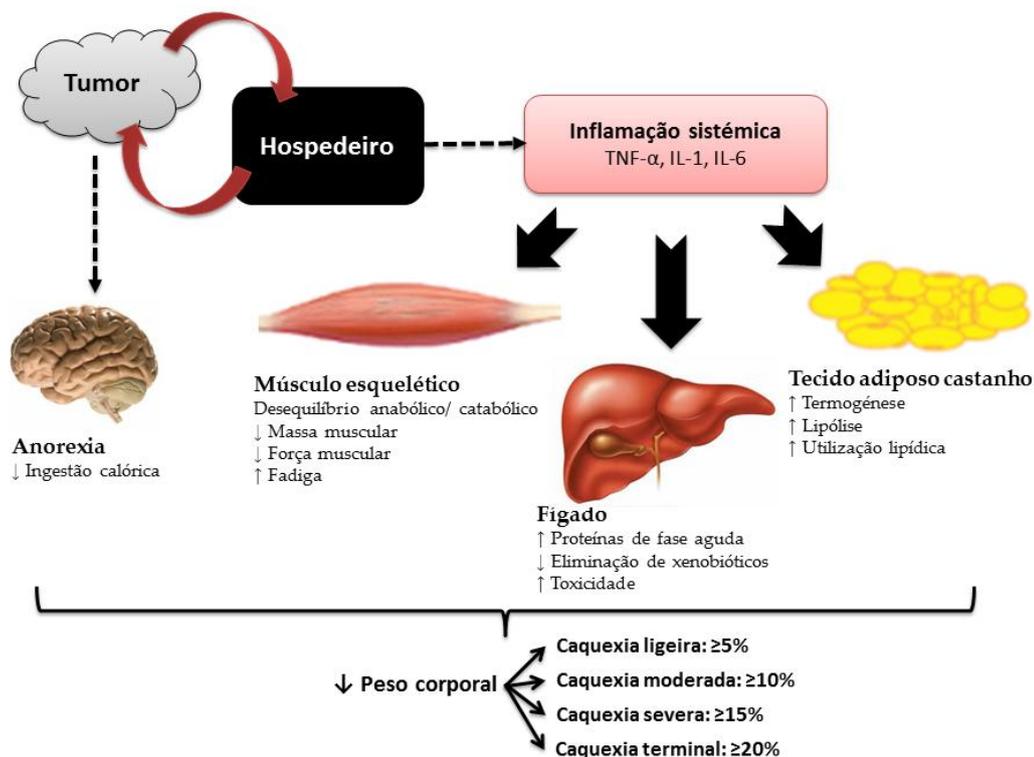


Figura 1- Influência dos mediadores pro-inflamatórios associados ao tumor no tecido adiposo, muscular esquelético e hepático bem como o seu resultado em termos de perda de peso corporal (adaptado de [1,11]).

Adicionalmente à produção de mediadores pró-inflamatórios induzida pelas células tumorais, vários estudos têm sugerido que a caquexia é também mediada por fatores circulantes produzidos pelo tumor, os quais podem atuar de forma autócrina ou parácrina (como por exemplo ao nível dos fibroblastos e células endoteliais) para promover um ambiente favorável à proliferação do tumor. No entanto, estes fatores também promovem caquexia [4,11,12]. O fator indutor de proteólise (PIF) é um proteoglicano de 24kDa com capacidade de induzir a proteólise muscular e ainda de inibir o consumo de glucose por parte do músculo esquelético promovendo o seu catabolismo [2,4,12,19]. Alguns estudos demonstraram que o catabolismo muscular é mediado pelo PIF via NF- κ B com ativação da UPP (figura 2) e que o mesmo promove a produção de citocinas pro-inflamatórias como a IL-6 e -8, aumentando a inflamação sistêmica subjacente à caquexia [4,2,17]. Para além de indutor da proteólise, o PIF tem também capacidade para induzir apoptose celular via ativação de caspases [4,12]. O fator mobilizador de lípidos (LMF) é produzido pelo tumor e induz a depleção de gordura através do aumento da lipólise. Alguns estudos sugerem que este atua diretamente no tecido adiposo provocando a libertação de ácidos gordos e glicerol através do aumento intracelular de AMP cíclico, mimetizando a ação de hormonas lipolíticas [3,7,12,18].

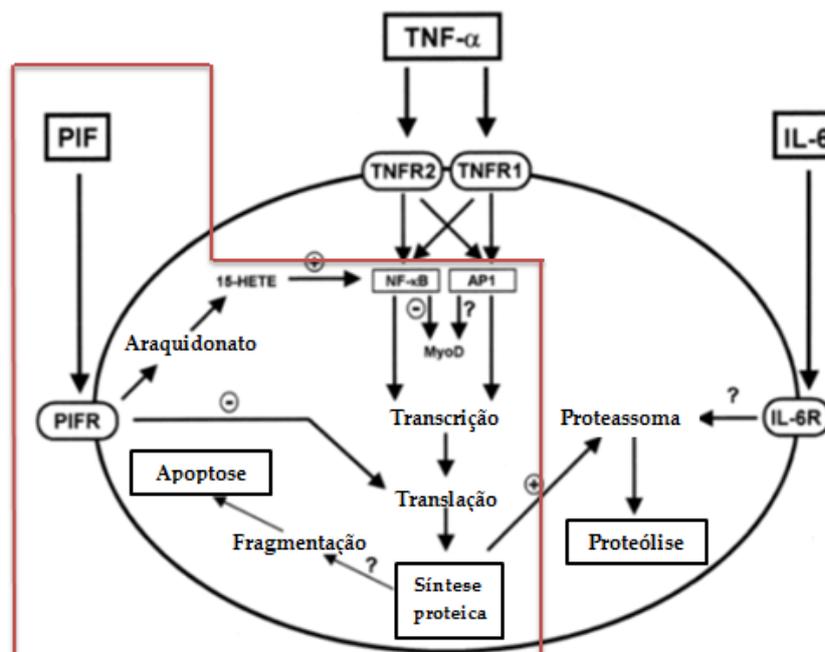


Figura 2- Ação dos mediadores catabólicos PIF, TNF- α e IL-6 na síntese e degradação proteica. O PIF é responsável pelo catabolismo muscular e pode atuar

através da via NF- κ B, com consequente ativação da UPP. Também pode induzir a ativação da apoptose (adaptado de [4]).

1.2 Regulação da massa muscular esquelética

O músculo esquelético contribui em mais de 50% para o peso corporal e o controle da sua massa tem um papel fundamental na manutenção da condição física do indivíduo, no sistema imune e na regulação do metabolismo, para além de assegurar funções básicas como a locomoção, a capacidade de produção de força e a respiração [13,20,21]. O músculo esquelético é um tecido dinâmico cuja massa aumenta ou diminui em resposta a estímulos externos [2,21,22,23]. Em condições normais, a massa muscular esquelética é mantida graças ao equilíbrio entre a síntese e a degradação proteica [21]. As fibras musculares esqueléticas por serem células permanentes não têm capacidade proliferativa pelo que durante a fase do desenvolvimento pós-natal do tecido ou aquando de um estímulo ocorre um aumento dos mionúcleos por ativação de células satélite. Consequentemente, aumenta a quantidade de DNA e a síntese de proteínas em detrimento da sua degradação, resultando na hipertrofia das fibras [23,24,25]. No entanto, em resposta a mediadores induzidos pelo tumor ocorre um desequilíbrio entre estas vias com consequente diminuição do conteúdo proteico muscular, do diâmetro das fibras bem como da capacidade de produção de energia, culminando na perda de massa muscular, um fenómeno denominado de atrofia [2,6,26].

O catabolismo muscular subjacente à caquexia associada ao cancro também tem sido relacionado com o aumento da produção de ROS devido a alterações nutricionais ou à ativação não específica do sistema imune com elevada produção de citocinas pró-inflamatórias, e à diminuição da atividade de sistemas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD), a glutathione peroxidase (GPx) e a glutathione (GSH) [13,27,28]. Nos mamíferos, as moléculas de oxigénio e azoto são rapidamente convertidas em espécies reativas pró-oxidantes (ROS e espécies reativas de azoto (RNS)) de natureza radicalar ou não radicalar, como o anião superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o radical hidroxilo ($\bullet OH$) e o peroxinitrito ($ONOO^-$). Os alvos destas moléculas são as membranas lipídicas, as proteínas estruturais e reguladoras e os ácidos nucleicos. Em condições caracterizadas por níveis reduzidos de defesas antioxidantes ocorrem danos nas biomoléculas dos diferentes tecidos, com consequente comprometimento da sua funcionalidade. No músculo esquelético são várias as fontes de espécies oxidantes: i) a cadeia transportadora de eletrões mitocondrial (com produção significativa de $O_2^{\bullet-}$ pelos

complexos I e III); ii) aumento da atividade da xantina oxidase que reduz o oxigênio a $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 ; iii) aumento da atividade da óxido nítrico sintase responsável pela produção de óxido nítrico que em elevadas concentrações torna-se citotóxico [13,27]. Apesar de as ROS em níveis basais serem necessárias para a regulação da contração, quando em concentrações elevadas são lesivas para as fibras musculares, comprometendo a sua função [27]. Alguns estudos sugerem que as ROS estão envolvidas na ativação da via UPP quer por marcação de proteínas miofibrilares para degradação quer pela indução da expressão e atividade de componentes envolvidos nesta via proteolítica [27]. Experiências utilizando mioblastos expostos a H_2O_2 revelaram um aumento da atividade de ubiquitinação e expressão alterada de genes que codificam para componentes da via UPP, tais como a E214K e as ligases MAFbx e MuRF1. Este tipo de resposta é semelhante à induzida pelo $TNF-\alpha$, sugerindo que as ROS possivelmente atuam como mensageiros secundários no catabolismo muscular. Em modelos animais de atrofia muscular, o aumento da expressão da E3 ligase MAFbx parece ser dependente da ativação de fatores de transcrição da família FoxO, que são ativados por H_2O_2 [27].

1.2.1 Vias de sinalização subjacentes ao controlo da massa muscular

Diversos estudos têm sugerido que a regulação do tamanho das miofibras e da *performance* do músculo esquelético é dependente de uma rede complexa de vias de sinalização que se interligam [24]. A massa do músculo esquelético é regulada por uma série de processos: adição de mionúcleos às miofibras, síntese de proteínas musculares e proteólise muscular [22]. O catabolismo muscular esquelético resulta de um desequilíbrio na ativação das diferentes vias de sinalização com consequente aumento da degradação proteica [16]. Na figura 3 estão representadas as vias de sinalização envolvidas no controlo da massa muscular, os seus intervenientes bem como o seu resultado em termos de regulação proteica.

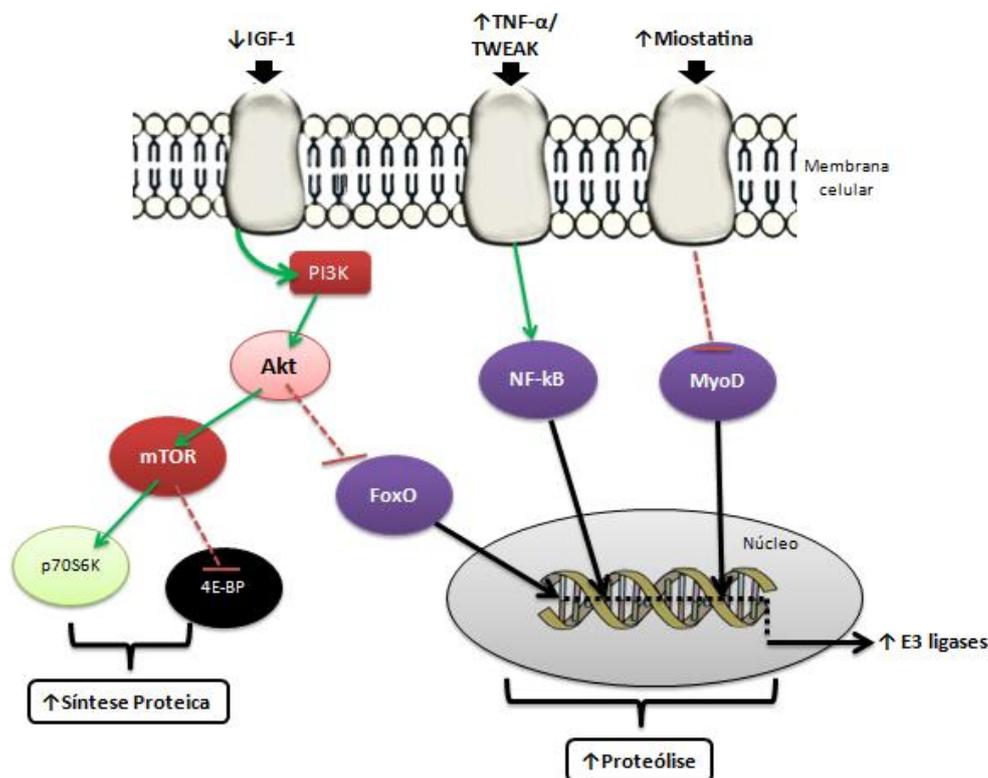


Figura 3- Principais vias de sinalização responsáveis pela regulação e controlo da massa muscular esquelética. A IGF-1 ativa a via PI3K-Akt-mTOR que é responsável pelo aumento da síntese de proteínas musculares e pela inibição da sua degradação; Citocinas pró- inflamatórias como o TNF- α promovem um aumento da expressão de enzimas do sistema ubiquitina-proteassoma (UPP) responsável pela degradação proteica. A miostatina, por sua vez, ativa a proteólise via inibição da expressão/atividade da MyoD (adaptado de [16]).

1.2.1.1. Via da ubiquitina-proteassoma

A proteólise muscular esquelética ocorre por ativação de sistemas proteolíticos, incluindo a via lisossomal, as calpaínas, as caspases e a via da ubiquitina-proteassoma que contribuem de forma diferente para a resposta atrofica [24,27,29,30]. Na via autofágica-lisossomal, porções de citoplasma e organelos celulares são rodeados por autofagossomas que ao se fundirem com os lisossomas digerem as proteínas [9]. As catepsinas são proteases presentes nos lisossomas em concentrações elevadas pelo que determinam a capacidade proteolítica dos mesmos e medeiam a via lisossomal. O aumento da sua atividade tem sido relacionado com o aumento da lise de proteínas membranares e consequente catabolismo. Especificamente, a expressão da catepsina-L

parece estar aumentada na fase inicial de estados catabólicos [15,27]. Adicionalmente, o músculo esquelético possui elevadas quantidades de calpaínas que fazem parte de uma família de proteases cisteínicas reguladas pelo cálcio. No músculo esquelético são expressas 3 calpaínas (1/ μ , 2/m e 3), no entanto, apenas as calpaínas-1 e -2 têm sido associadas à degradação de proteínas miofibrilares tais como a titina, nebulina, durante o catabolismo muscular. Estudos revelaram que a sub-regulação da calpastatina (inibidor endógeno da atividade das calpaínas) poderá ser um mecanismo responsável pela atrofia muscular [16,27]. Por fim, as caspases pertencem a uma família de proteases cisteínicas que estão envolvidas na ativação do fenómeno de apoptose. Estudos recentes têm demonstrado um papel fundamental da caspase-3 na diferenciação muscular bem como na ativação dos sistemas proteolíticos lisossomal, das calpaínas e da UPP dado que esta tem a capacidade de clivar fragmentos de actina e actomiosina em fragmentos de 14kDa que servem de indutores da proteólise muscular [13,16,27,31]. Em termos quantitativos, a via da ubiquitina-proteassoma constitui um dos principais mecanismos de proteólise no músculo esquelético.

A ubiquitina é um peptídeo pequeno, de 8kDa, presente em todos os tipos de células cuja função é interagir com substratos/proteínas específicas marcando-os para serem reconhecidos e degradados pelo proteassoma [16,32]. Neste processo participam três sistemas enzimáticos chave, E1 *ubiquitin-activating enzyme*, E2 *ubiquitin-conjugated enzyme* e E3 *ubiquitin-ligated enzyme*, que catalisam a conjugação da ubiquitina ao substrato alvo [16,24,25]. Após a poliubiquitinação, a proteína marcada é reconhecida por uma protease multicatalítica dependente de ATP, o proteassoma 26S que degrada a proteína alvo em oligopeptídeos [16,32] (figura 4). No músculo esquelético foram descritas duas ligases E3 específicas, a MAFbx e a MuRF1, que regulam a massa muscular [16].

O gene *MuRF1* codifica uma proteína com 3 domínios essenciais, um '*ring finger*' necessário para a atividade da ubiquitina ligase, uma '*B-box*' e um domínio '*coil-coil*' responsável pela formação de heterodímeros entre MuRF1 e MuRF2 que parecem ligar-se à proteína miofibrilar titina. O gene *MAFbx* codifica uma proteína que contém um domínio '*F-box*', característico de E3 ubiquitina ligases, responsável pela ligação do substrato após este ter sido fosforilado [16,24,25,32,33]. A MAFbx promove a degradação de proteínas musculares como o MyoD (fator de transcrição muscular) e o fator eIF3f (ativador da síntese proteica). A MuRF1 controla a degradação de proteínas

musculares estruturais como a troponina I, actina e miosinas de cadeia pesada, leve e de ligação à proteína C [24,25,30,32,34]. Em estudos realizados com ratos em que a expressão de MAFbx e MuRF1 foi suprimida verificou-se que os animais manifestavam resistência à atrofia muscular [25]. Para além destas E3 ligases, a TRAF6 (*TNF receptor-associated factor 6*) também intervém na conjugação de cadeias de poliubiquitina ao resíduo de Lys63 de proteínas alvo, sinalizando-as para serem degradadas pelo proteassoma [24,25,30]. Estudos feitos com ratos *TRAF6-knockout* revelaram uma menor perda de massa muscular, da lise de proteínas musculares específicas, da diminuição da área de secção transversal das fibras bem como da diminuída capacidade contrátil e de produção de força relativamente a dois modelos de atrofia muscular (denervação e caquexia associada ao cancro). Para além disso, a inibição de TRAF6 mostrou também ser um modulador negativo da expressão dos atrogenes (MAFbx e MuRF1), através da inibição das vias do NF- κ B, AMPK (*AMP-activated protein kinase*), JNK (*c-Jun-N-terminal kinase*) e p38 MAPK (*p38 mitogen-activated protein kinase*) [21,25,30].

A expressão das enzimas responsáveis pelo controlo da ubiquitinação e consequente degradação proteica pelo proteassoma pode ser modulada por uma série de fatores tais como a insulina, IGF-1, TNF- α , TWEAK. Por exemplo, a diminuição dos níveis de insulina leva a um aumento da expressão tanto da ubiquitina como de MAFbx. As citocinas pro-inflamatórias como o TNF- α são também responsáveis pelo aumento da expressão de ubiquitina e pela acumulação de proteínas poliubiquitinadas [25]. Em condições fisiológicas a expressão de TWEAK (*TNF-like weak inducer of apoptosis*) e do recetor Fn14 (*receptor fibroblast growth factor inducible 14*) é reduzida, no entanto, em condições de dano tecidual, como por exemplo em situações de hipóxia, stress oxidativo, lesões mecânicas ou químicas, inflamação e crescimento tumoral, a sua expressão aumenta com ativação da via TWEAK/Fn14, culminando em atrofia muscular esquelética [21,30,35].

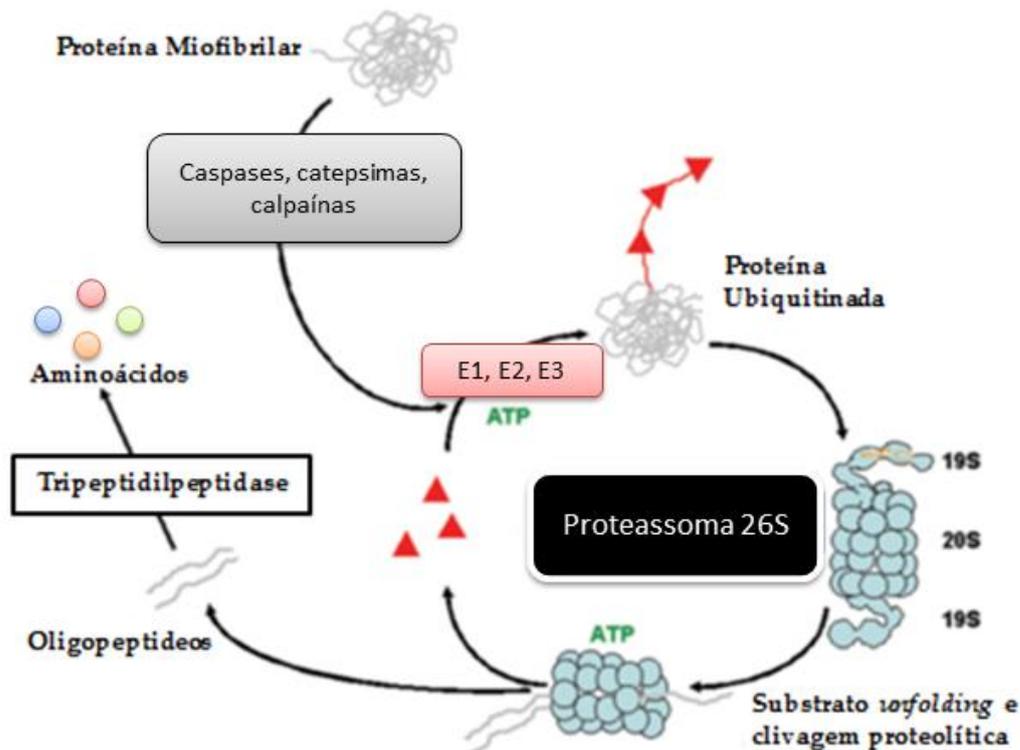


Figura 4- Mecanismos intracelulares subjacentes à proteólise muscular, dando particular ênfase ao sistema UPP. Neste processo intervêm os sistemas enzimáticos E1, E2 e E3 que promovem a ligação da ubiquitina à proteína a ser degradada pelo proteassoma 26S (adaptado de [16]).

1.2.1.2. Via TWEAK/Fn14

A TWEAK é uma proteína pertencente à super-família TNF e ao se ligar ao seu receptor Fn14 regula uma série de respostas celulares tais como proliferação, diferenciação, apoptose, inflamação e fibrose [16,21,25,30]. A ligação do TWEAK ao receptor Fn14 causa a trimerização do mesmo, o que promove a interação do complexo TRAF2/cIAP1 ao seu domínio citoplasmático e consequente ativação de uma série de proteínas sinalizadoras como TRAF6, NF- κ B, IKK e MAPK, responsáveis pela ativação de fatores de transcrição envolvidos na regulação de vias catabólicas (figura 5) [21,30]. Estudos demonstraram que um dos mecanismos pelos quais a TWEAK induz atrofia muscular é através do aumento da transcrição/expressão da MuRF1 que estimula a conjugação da ubiquitina às miosinas de cadeia pesada (MHC), levando à sua degradação. A TWEAK também promove, de uma forma direta, a ativação do fator de transcrição NF- κ B que promove o aumento da expressão de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias e de MuRF [30]. Adicionalmente, a TWEAK tem sido associada ao

aumento da expressão de componentes do sistema lisossomal e das caspases. Recentemente foi sugerido o envolvimento desta citocina na regulação negativa da capacidade regenerativa do músculo esquelético por inibição da auto-regeneração e proliferação das células satélite, bem como da fusão e diferenciação dos mioblastos em células multinucleadas [21].

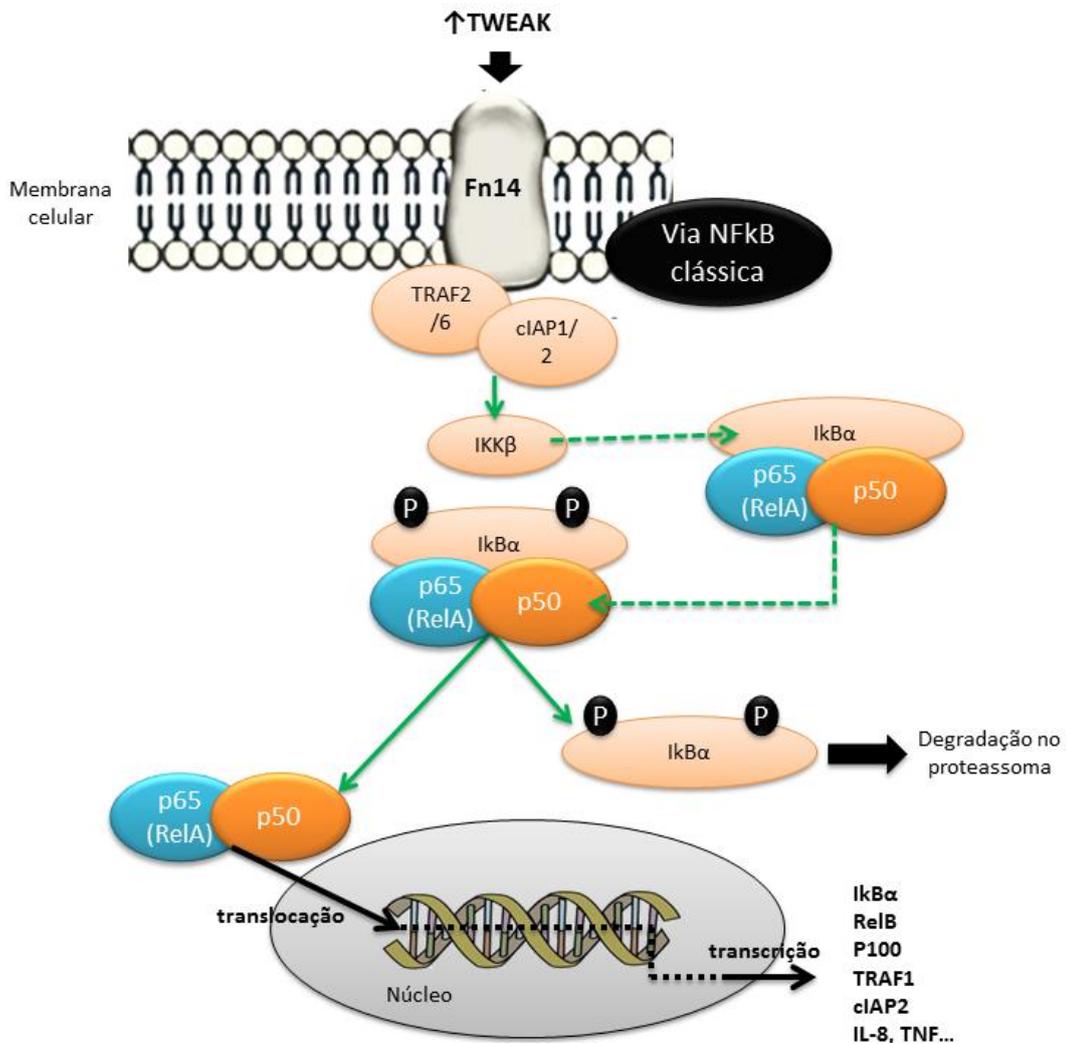


Figura 5- Ativação dos fatores de transcrição NF-κB pela TWEAK. A ligação da TWEAK ao recetor Fn14 promove a ativação de uma série de proteínas sinalizadoras como é o caso da TRAF6, NF-κB, IKK e MAPK (adaptado de [21,35]).

1.2.1.3. Via da miostatina

A miostatina, ou GDF-8, pertence à família TGF- β e é produzida pelos tecidos muscular e adiposo (neste último em menor extensão). Esta citocina é um regulador negativo do desenvolvimento do músculo esquelético, atuando por ligação a recetores específicos das fibras musculares promovendo o seu catabolismo. A miostatina liga-se com elevada afinidade ao recetor ActRIIB e regula a expressão de genes alvo através de uma cascata de eventos intracelulares. A ligação da miostatina ao ActRIIB promove o recrutamento e fosforilação de co-recetores, ALK-4 e ALK-5 (*Activin receptor-like kinases*) tipo I; estes por sua vez fosforilam Smad2 e 3 que formam um complexo com a Smad4. O complexo Smad2/3/4 é translocado para o núcleo onde regula a expressão de genes alvo específicos como é o caso do gene *MyoD* entre outros genes que codificam fatores miogénicos (figura 6) [7,16,22,23,24,36,37]. O aumento da expressão de miostatina induz a atrofia muscular esquelética por promover a proteólise de proteínas miofibrilares como a miosina de cadeia pesada IIB (MHCIIb), a troponina I e a desmina [36]. Estudos demonstraram que uma sobre-expressão da miostatina no músculo esquelético resulta em atrofia muscular pronunciada enquanto a sua sub-expressão está associada a hipertrofia de fibras do tipo IIB [7,22,23,24,37]. Para além de inibir a expressão/atividade da MyoD, a miostatina tem também capacidade de inibir a fosforilação do Akt promovendo uma sub-regulação da via IGF-1/PI3K/Akt e de promover o aumento da expressão dos atrogenes MAFbx e MuRF-1 (figura 5) [7,23,24,36].

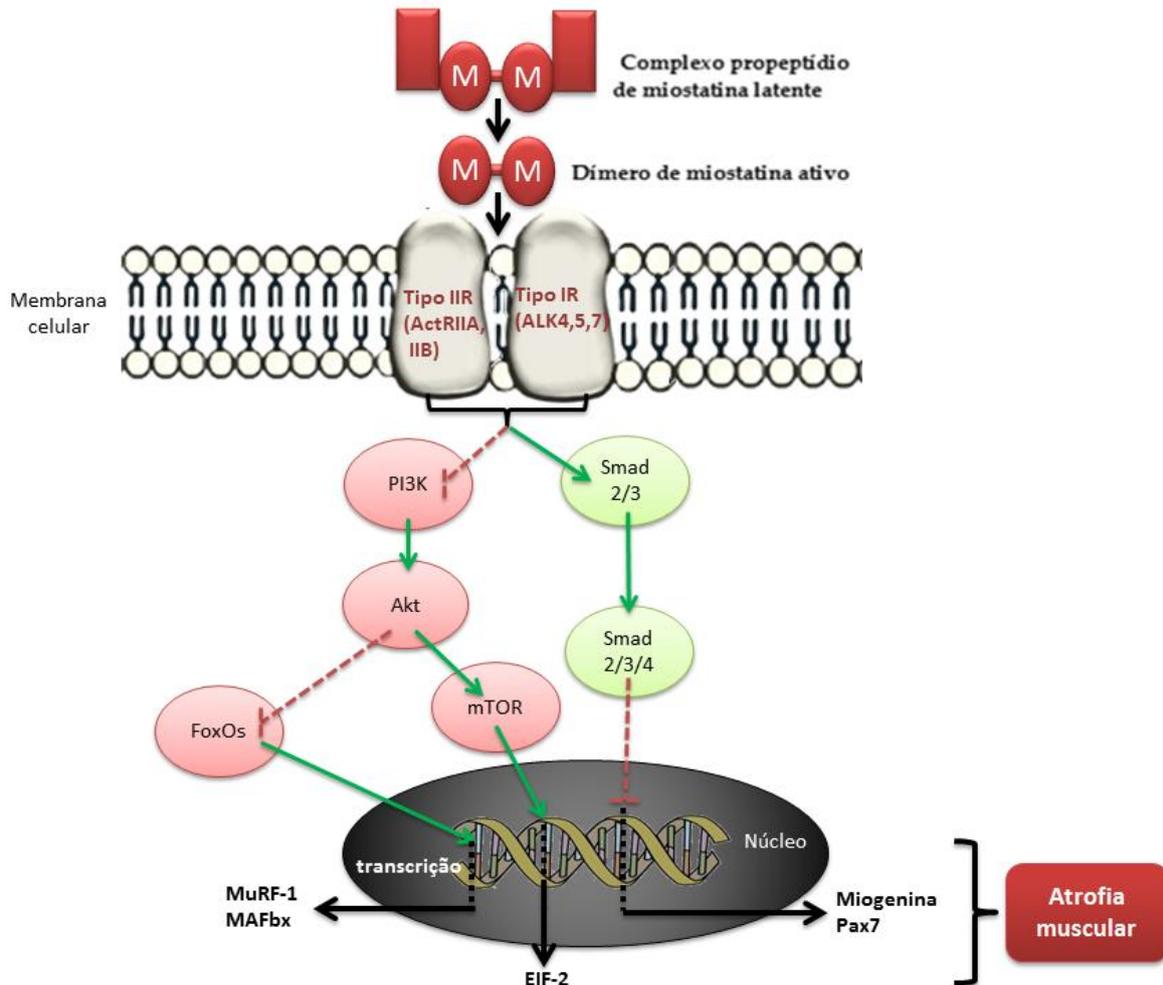


Figura 6- Ação da miostatina na regulação da massa muscular esquelética. A ligação da miostatina ao receptor ActRIIB promove a fosforilação de ALK-4 e ALK-5; estes por sua vez fosforilam Smad2 e 3 que formam um complexo com a Smad4 que é translocado para o núcleo onde regula a expressão de genes alvo envolvidos na atrofia muscular (adaptado de [36]).

1.2.1.4. Via Akt/mTOR

No período pós-natal são vários os fatores responsáveis pelo anabolismo muscular esquelético, como por exemplo a hormona de crescimento (GH), os androgénios, a insulina e o fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1) [22,24,32]. O IGF-1 apresenta várias isoformas sendo que no músculo esquelético a mais expressa é a IGF-1Ea [22]. A interação de IGF-1 com o respetivo recetor ativa a cascata de sinalização intracelular PI3K/Akt com consequente aumento da síntese proteica [22,25]. A estimulação da síntese proteica envolve, primeiramente, a interação de IGF-1 com o seu recetor tirosina cinase com consequente fosforilação da IRS-1, que por sua vez é

responsável por ativar a via de sinalização PI3K/Akt. A PI3K, uma vez ativada, fosforila o fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato a fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato criando um local de ligação lipídica para o Akt, facilitando a fosforilação/ativação deste pelo PDK-1. Esta cinase uma vez ativada fosforila o mTOR que por sua vez fosforila o p70S6K ativando-o, fosforila ainda a 4E-BP1 inibindo-a e a GSK3- β que atua como repressora do eIF-2B (figura 7) por diminuição da capacidade de reciclagem ribossomal [23,38,39].

A ativação da Akt para além de ativar a síntese proteica, também bloqueia a degradação de proteínas musculares, através da inibição da transcrição dos atrogenes *MAFbx* e *MuRF1* por fosforilação dos fatores de transcrição FoxO [23,24,31,38,39,40]. Os fatores de transcrição da família FoxO têm sido implicados na regulação da expressão de componentes da via proteolítica ubiquitina-proteassoma, de reguladores da morte celular e de inibidores do ciclo celular e metabolismo. Assim, quando fosforilados pela Akt estes fatores FoxO são translocados do núcleo para o citoplasma não mediando a transcrição de genes [16,23,38,39]. Na figura 6 é possível observar que a fosforilação da Akt leva à inibição dos fatores de transcrição FoxO que por sua vez não regulam a transcrição dos genes *MuRF1* e *MAFbx*, inibindo a degradação proteica. Estudos recentes demonstraram que a diminuição da fosforilação de IRS-1, PI3K, Akt, mTOR e p70S6K bem como baixos níveis de IGF-1 traduzem-se em atrofia muscular [33,40] e têm sido relacionadas com doenças como o cancro [16,32]. Ratos *knockout* para IGF-1 e/ou para o seu recetor evidenciaram uma diminuição da massa muscular esquelética. Por outro lado, a sobre-expressão de IGF-1 causa um aumento significativo da síntese proteica com consequente hipertrofia das miofibras [22].

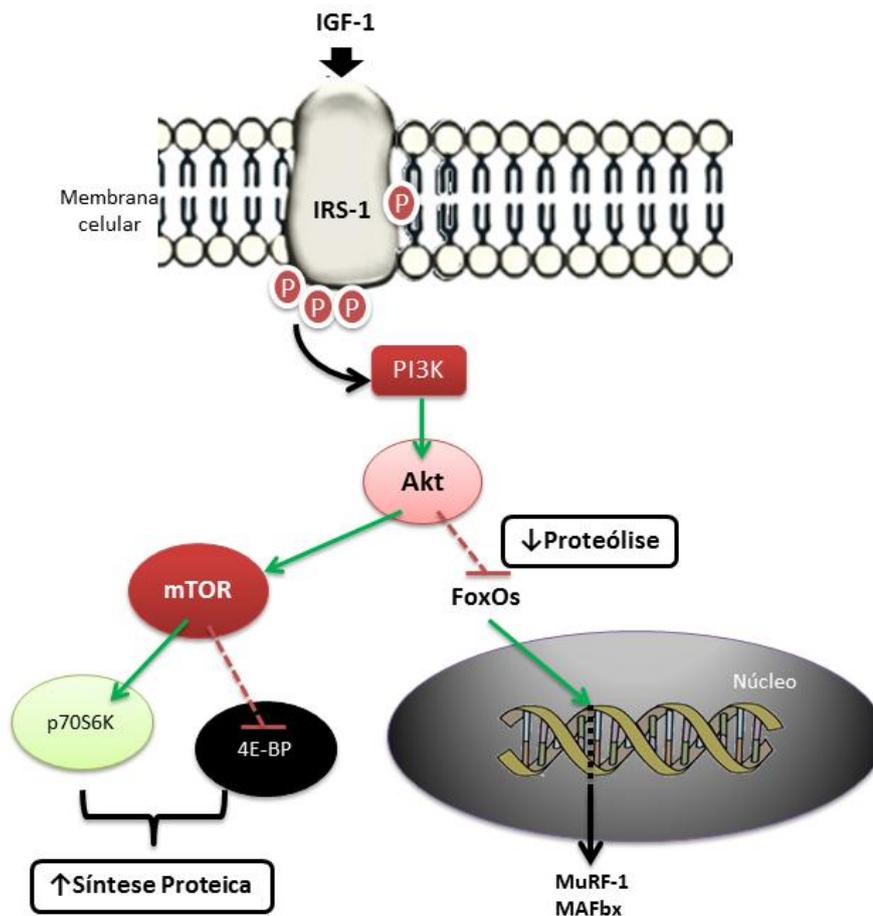


Figura 7- Papel do fator de crescimento IGF-1 na ativação da via PI3K-Akt-mTOR que resulta no aumento de síntese proteica e na inibição da degradação proteica por regulação negativa dos atrogenes MuRF1 e MAFbx (adaptado de [40]).

1.2.1.5. Apoptose

A atrofia muscular subjacente à caquexia associada ao cancro também parece estar intrinsecamente relacionada com a ativação da apoptose via fragmentação do DNA [13,23,31]. As caspases, proteases aspartato-específicas dependentes de cisteína, são um dos reguladores mais importantes no processo de apoptose (figura 8). A via apoptótica é iniciada aquando da ligação de um ligando a um recetor de morte celular (Fas ou recetor de TNF (TNFR)), resultando no recrutamento de proteínas adaptadoras, com formação de um complexo de sinalização intracelular e ativação da caspase-8. Por outro lado, a libertação do citocromo c pela mitocôndria em resposta a estímulos pró-apoptóticos promove, entre outros efeitos, a ativação da caspase-9. A ativação de caspases iniciadoras como as caspases-8, -9 e -12 levam à proteólise e ativação de caspases

efetoras tais como as caspases-3, -6 e -7, culminando na degradação do conteúdo celular e fragmentação do DNA (figura 8) [41].

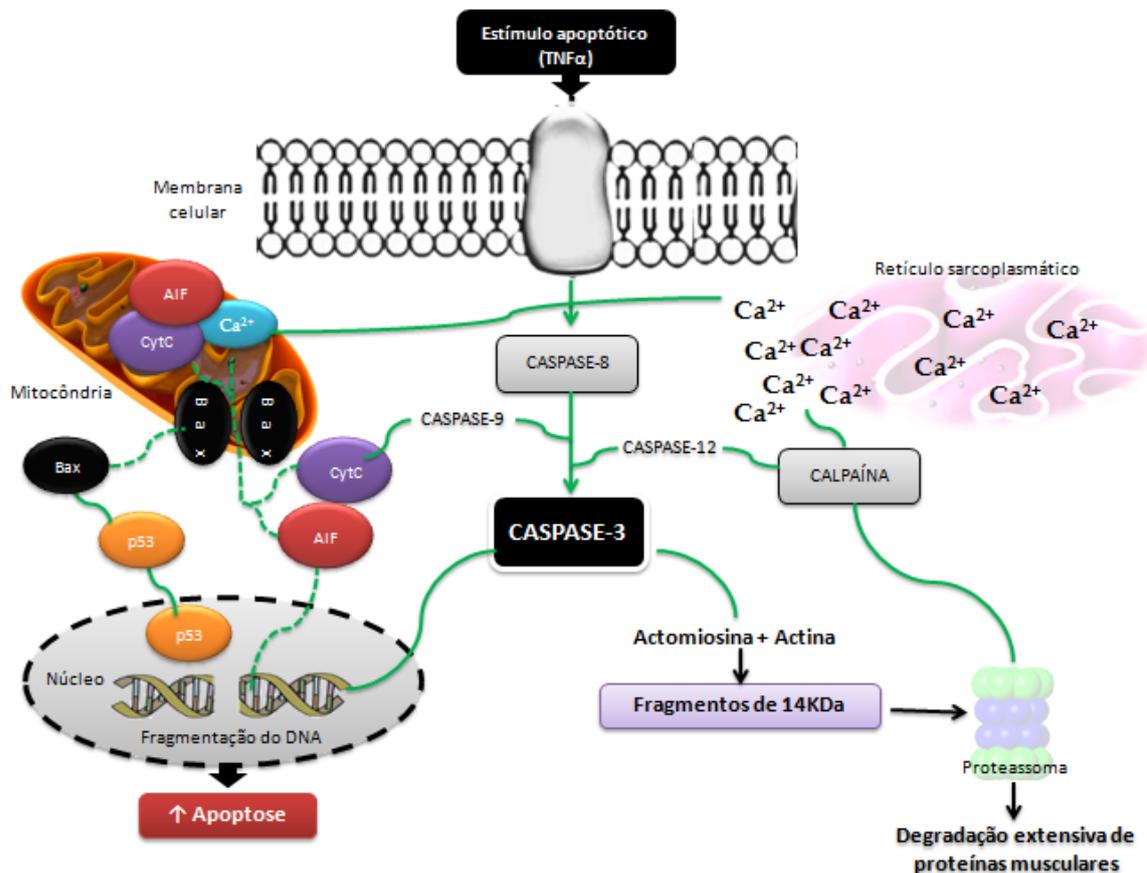


Figura 8- Apoptose no músculo esquelético. Esta pode ser iniciada através de eventos localizados na mitocôndria, recetores de morte celular, retículo sarcoplasmático e/ou núcleo. Uma vez iniciada pode resultar na ativação de enzimas proteolíticas (caspases e calpaínas) ou de eventos independentes da ativação das caspases, culminando na fragmentação do DNA e destruição de proteínas miofibrilares. A caspase-3 está envolvida na apoptose muscular e na ativação de vias proteolíticas com consequente aumento da degradação de proteínas musculares (adaptado de [31,41]).

A natureza multinucleada das fibras musculares bem como a flexibilidade do número de mionúcleos mediante os fenómenos de hipertrofia e atrofia são os fatores que distinguem este tecido de todos os outros relativamente ao processo de morte celular. Neste contexto surgiu o conceito de “domínio mionuclear” que se define como uma porção de citoplasma que é controlada por um único núcleo. Assim, quando a fibra muscular atrofia em resposta a uma série de condições, ocorre “apoptose mionuclear”, ou seja, apenas alguns mionúcleos individuais e respetivos domínios são eliminados seletivamente [23,32,41,42]. Estudos recentes revelaram que a expressão basal de

fatores apoptóticos bem como os níveis de fragmentação de DNA diferem de músculo para músculo, tendo em conta o conteúdo mitocondrial e o tipo de fibra [41]. São vários os fatores intervenientes na apoptose pelo que o fator de transcrição e gene supressor tumoral p53 tem merecido especial atenção. O p53 parece ter um papel preponderante na regulação de processos anti-proliferativos, evitando a proliferação de células lesadas em resposta a sinais de dano celular. Este uma vez ativado induz a expressão de genes envolvidos na apoptose tais como de membros da família Bcl-2, com aumento da expressão de membros pró-apoptóticos como o Bax, e da família Hsp, tal como a Hsp70, uma chaperona com capacidade de inibir a agregação de proteínas mal formadas bem como de proteger a célula da apoptose bloqueando a translocação do fator indutor de apoptose (AIF) e Bax, ligando-se ao fator ativador da protease apoptótica 1 (Apaf-1) para inibir a formação do apoptossoma e regulando a sinalização dos recetores de morte (figura 8) [41].

1.3 Impacto do exercício físico na caquexia associada ao cancro

A caquexia tem um impacto negativo na qualidade de vida do doente oncológico e na morbidade e mortalidade associada à doença pelo que se tem procurado abordagens terapêuticas, farmacológicas e/ou não farmacológicas, que permitam contrariar a perda de massa corporal [10,43,44]. Alguns estudos têm sugerido fármacos para tratar a caquexia [45]. Os análogos de CRF2R têm-se mostrado úteis na prevenção do catabolismo muscular em modelos de caquexia. Compostos como o adenilato, lactacistina e β -lactona, ao inibirem a via da UPP parecem bloquear em cerca de 90% a degradação proteica muscular. A administração de eritropoietina mostrou também ter efeitos positivos na caquexia associada ao cancro na medida em que diminui a produção da citocina pró-inflamatória IL-6 [45].

De entre as abordagens terapêuticas não farmacológicas, o exercício físico afigura-se como uma estratégia com potencial aplicação na prevenção e/ou tratamento da caquexia associada ao cancro, atendendo ao seu papel anabólico no músculo esquelético [28]. Apesar do exercício físico induzir uma resposta inflamatória, o aumento de citocinas pró-inflamatórias é pouco significativo, ao contrário da que ocorre em, por exemplo, infeções [28]. A IL-6 é a primeira citocina em circulação cujos níveis aumentam durante a prática de exercício, tendo sido observada uma associação da concentração de IL-6

com a intensidade e duração do mesmo. Para além da IL-6, o exercício também promove a produção de IL-10 (responsável por inibir a produção das citocinas IL-1 α , IL-1 β e TNF- α) e de antagonistas das citocinas pró-inflamatórias IL-1 e TNF- α tais como IL-1ra, sTNF-r1 e STNF-r2 que bloqueiam as vias de sinalização subjacentes ao catabolismo muscular [13,28]. O aumento de IL-10 e TNF- α promovido pelo exercício físico com conseqüente aumento do rácio IL-10/ TNF- α parece estar associado a um melhor prognóstico de caquexia, uma vez que contraria a inflamação promovida pelo tumor [13,28,46,47].

Existem dois tipos principais de exercício físico, exercício de reduzida tensão mecânica e longa duração (ERTMLD) (conhecido por exercício de endurance) e exercício de elevada tensão mecânica e curta duração (EETMCD) (conhecido por exercício de resistência). Vários estudos têm sugerido que o ERTMLD parece ser benéfico em pacientes com cancro na medida em que diminui a inflamação crónica associada ao cancro uma vez que induz a produção de citocinas anti-inflamatórias (IL-10) e de antagonistas de IL-1 e TNF- α (IL-1ra, sTNF-r1 e STNF-r2), melhora a função endotelial e a sensibilidade à insulina para além de melhorar a capacidade física destes pacientes [9,28,47]. Este tipo de exercício tem sido associado a um aumento da síntese proteica, da razão massa de músculo/peso corporal e parece promover um fenótipo muscular mais resistente à fadiga [13,46,48]. O ERTMLD também tem um efeito antioxidante ao estimular a atividade de enzimas como a SOD e a GPx, protegendo as biomoléculas do músculo esquelético do dano oxidativo. Os níveis de GSH também aumentam com o ERTMLD [27,28]. A atenuação dos níveis de ROS está também relacionada com a diminuição da atividade da via ubiquitina/proteassoma, com conseqüente atenuação da atrofia muscular [47] (figura 9). Mais ainda, a migração das moléculas transportadoras de glucose, GLUT-4, para a membrana celular também aumenta em resposta a este tipo de exercício permitindo a entrada de glucose na fibra muscular. Desta forma é aumentada a sensibilidade à insulina em pacientes com caquexia, que geralmente apresentam comprometimento da mesma [28]. Tem sido verificado que os pacientes oncológicos que praticam este tipo de exercício apresentam tumores mais pequenos do que os pacientes sedentários, embora os mecanismos subjacentes não estejam completamente esclarecidos [13,28].

Por outro lado, o EETMCD parece estimular a síntese de proteínas musculares (proteínas miofibrilares, miosina e actina) resultando num aumento da área de seção transversal das fibras musculares esqueléticas com conseqüente aumento da capacidade

de produção de força muscular (em cerca de 41,3%), aumento da massa muscular (em cerca de 1%) e da *performance* física. Esta ação parece ser mediada pelo IGF-1, via PI3K/Akt/mTOR (figura 9). Estudos revelaram que após um período de 48h de EETMCD ocorre um aumento significativo de IGF-1, da fosforilação de mTOR e p70sk6 e aumento dos níveis de MyoD, e que após 13 semanas de um programa de EETMCD ocorre um aumento de IGF-1 em cerca de 20% o que sugere uma relação entre o aumento da expressão de IGF-1 promovida pelo exercício e a hipertrofia muscular [13,28,47,48,49,50,51]. Tem sido sugerido que a adaptação ao EETMCD é, efetivamente, o aumento da síntese proteica, nomeadamente de proteínas miofibrilares e que se deve à ativação seletiva da via do mTOR [46]. Mais ainda, este tipo de exercício físico parece modular positivamente os níveis de hormonas como a leptina e a adiponectina que se encontram diminuídas em pacientes com caquexia e estão associadas ao desenvolvimento de resistência à insulina, ao aumento dos níveis de lípidos séricos bem como ao aumento de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α [44]. Alguns autores verificaram uma relação positiva entre a prática deste tipo de exercício físico em pacientes com cancro da mama e a diminuição do risco de ocorrência de recidivas e de mortalidade [47].

De modo a inferir sobre o impacto de diferentes tipos de exercício na síntese diferencial de proteínas no músculo esquelético, foi desenhado um protocolo onde se submeteram indivíduos durante 10 semanas a um programa de EETMCD numa das pernas e a 10 semanas de ERTMLD na outra. Verificou-se que após o treino houve um aumento da síntese de proteínas miofibrilares e não de proteínas mitocondriais no músculo da perna submetida a treino de EETMCD enquanto na perna submetida a ERTMLD ocorreu um aumento de proteínas mitocondriais e não de miofibrilares. Estes resultados sugerem que o EETMCD é responsável pela hipertrofia muscular e o ERTMLD está envolvido na biogénese mitocondrial [50].

A prática aguda ou crónica de exercício físico regula ainda a massa muscular por inibir a apoptose no músculo esquelético (figura 8). São três os principais mecanismos pelos quais o exercício físico modula este processo de morte celular no músculo esquelético: i) alterações na expressão de proteínas associadas à apoptose; ii) aumento do número e função de mitocôndrias e iii) aumento do *status* antioxidante e diminuição da produção de ROS [41]. Os efeitos benéficos do exercício físico regular verificam-se, sobretudo, na modulação da expressão de proteínas anti- e pró-apoptóticas. Num estudo realizado com estimulação crónica do músculo esquelético de ratos saudáveis durante 7

dias observou-se um aumento do conteúdo total em proteínas pró-apoptóticas (AIF e citocromo c) sem alterações aparentes dos níveis das proteínas Bcl-2 e Bax [41]. Também tem sido sugerido que diferentes programas de exercício promovem um aumento do conteúdo em Hsp70 no músculo esquelético, inibindo a apoptose. A mitocôndria é um organelo chave na sinalização da apoptose pelo que alterações no seu número e função influenciam este processo no músculo esquelético. Mais ainda, sabe-se que a atividade contráctil crónica reduz a produção mitocondrial de ROS e aumenta os níveis de MnSOD, efeitos que têm sido associados à diminuição de proteínas apoptóticas bem como à menor fragmentação de DNA [41].

Apesar dos potenciais benefícios do exercício físico regular na atenuação da perda de massa muscular e, conseqüentemente, de massa corporal dos pacientes oncológicos, quando o exercício é praticado de forma aguda e descontinuada tende a induzir alterações orgânicas deletérias, nomeadamente o aumento de ROS e conseqüentemente o dano oxidativo das biomoléculas da fibra muscular esquelética [52,53]. Estudos indicaram uma diminuição acentuada das concentrações de GSH e de vitamina E no músculo esquelético após a prática de exercício físico agudo. Por outro lado, o exercício físico praticado de forma regular e continuada, promove um aumento das defesas antioxidantes, conferindo proteção contra danos oxidativos [52,53].

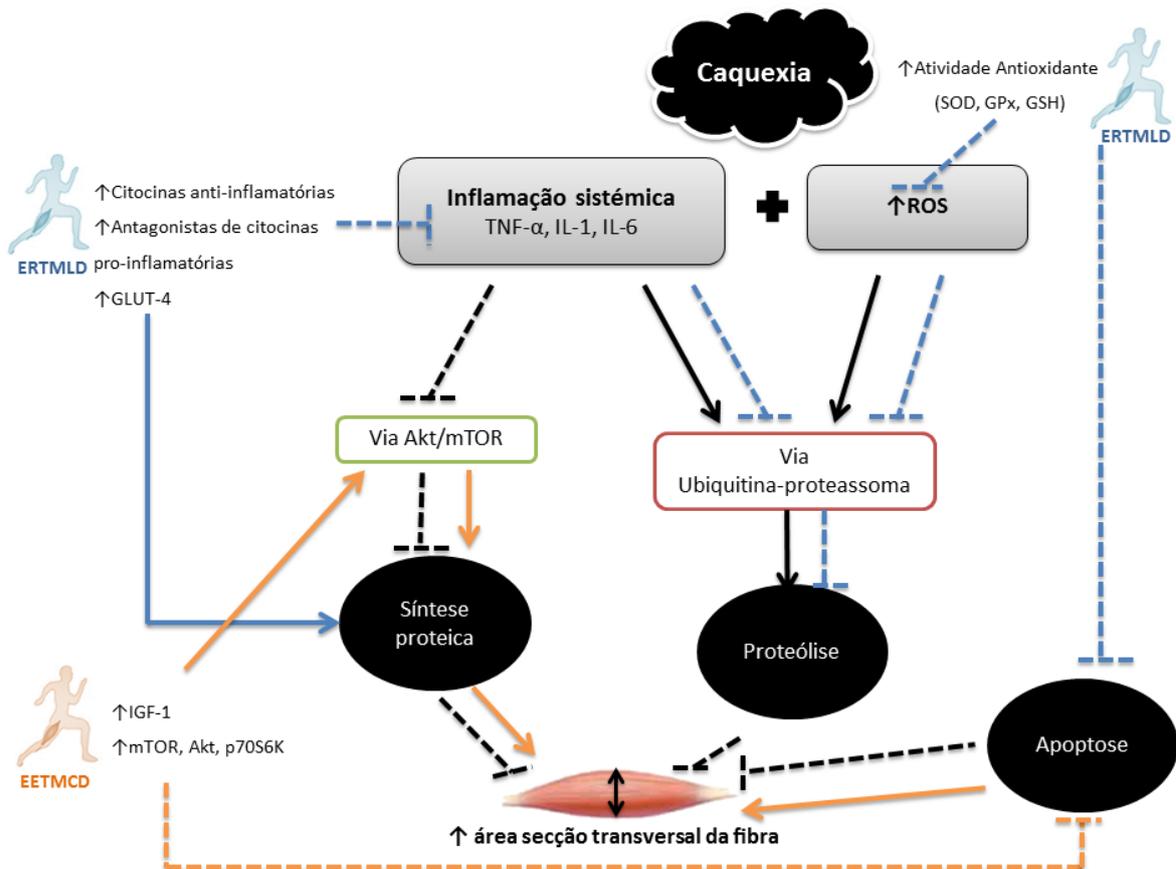


Figura 9- Mecanismos moleculares que medeiam a síntese e degradação proteica subjacente à caquexia associada ao câncer e o papel do exercício físico na regulação dos mesmos e consequentemente na modulação da área de seção transversal da fibra. A prática de exercício físico de endurance (ERTMLD) modula negativamente a inflamação crônica associada ao tumor, a produção de ROS, a via da ubiquitina/proteassoma e a apoptose. O exercício de resistência (EETMCD) ativa a via hipertrófica Akt/mTOR e modula negativamente a apoptose, com consequente aumento da área de seção transversal da fibra muscular (adaptado de [28]).

Objetivos

A caquexia associada ao cancro caracteriza-se por um acentuado catabolismo muscular esquelético com conseqüente perda de peso corporal e comprometimento da qualidade de vida do paciente oncológico. No sentido de estudar os mecanismos moleculares subjacentes à caquexia associada ao cancro da mama e o impacto da prática de exercício físico regular praticado ao longo da vida na regulação do catabolismo muscular, o presente trabalho teve como objetivos específicos:

- i) Relacionar as alterações sistémicas induzidas por tumores da mama com o catabolismo muscular esquelético;
- ii) Caracterizar os mecanismos moleculares que regulam a massa muscular esquelética nos animais com tumores mamários;
- iii) Avaliar o papel do exercício físico de *endurance* (ERTMLD) praticado ao longo da vida na regulação da massa muscular esquelética e dos mecanismos moleculares subjacentes.

Material & Métodos

1. Reagentes

O carcinogénico 1-metil-1-nitrosureia (MNU) foi obtido da Sigma. Os anticorpos *rabbit* policlonal anti-MuRF1 (ab77577), *rabbit* policlonal anti-TWEAK (ab37170), *rabbit* policlonal anti-GAPDH (ab9485), *mouse* monoclonal anti-ATPB, *rabbit* policlonal anti-GDF8 (ab996), *rabbit* monoclonal anti-TRAF6 (ab33915), *rabbit* policlonal anti-fosfo-Smad3 (ab51451), *rabbit* monoclonal anti-p38 MAPK (ab170099) e *rabbit* policlonal anti-IL-6 (ab6672) foram adquiridos da Abcam (Cambridge, UK). O anticorpo *rabbit* policlonal anti-atrogina (AP2041) foi obtido da ECM Biosciences (KY, USA). Os anticorpos *rabbit* policlonais anti-mTOR (#2972) e anti-Akt (#9272) foram obtidos da Cell Signaling. Os anticorpos monoclonais *anti-rabbit* ou *anti-mouse* IgG peroxidase foram obtidos da GE Healthcare (UK). Os filmes de raio-X (Kodak Biomax Light Film) foram obtidos da Sigma. Os reagentes de quimioluminescência ECL foram adquiridos da Amersham Pharmacia Biotech.

2. Procedimento Experimental

De modo a concretizar os objetivos propostos para o presente estudo delineou-se a metodologia experimental apresentada na figura 10.

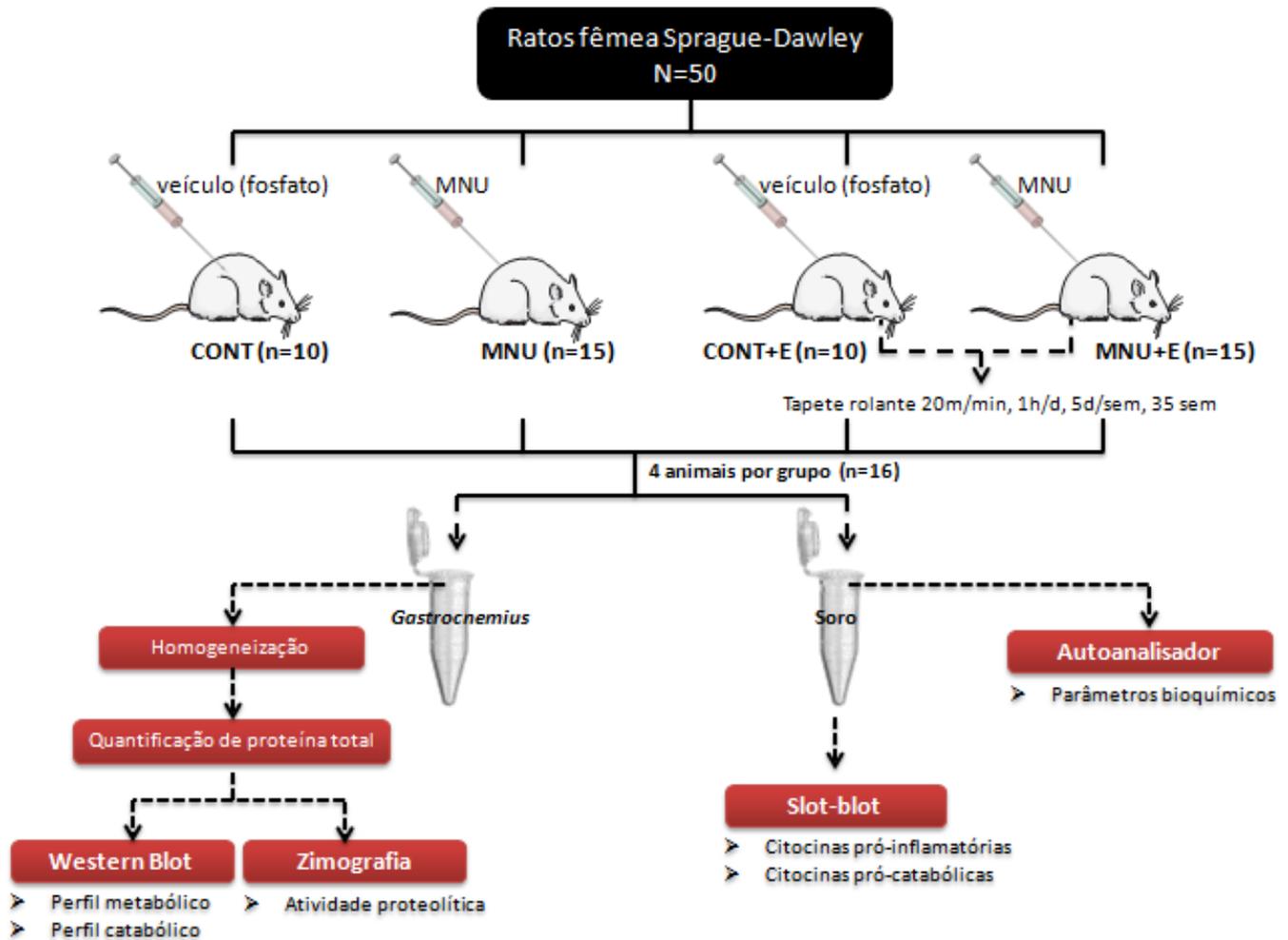


Figura 10- Esquema da metodologia experimental adotada no presente estudo. CONT- controlos sedentários; CONT+E- controlos exercitados; MNU- com tumores da mama; MNU+E- com tumores da mama exercitados.

Os grupos experimentais bem como as metodologias utilizadas são explicadas na seção seguinte.

3. Protocolo animal

Foram utilizados 50 ratos fêmea Sprague-Dawley (Harlan-Interfauna, Iberica, S.L; Barcelona, Espanha), obtidos com 38 dias de idade e com um peso médio inicial de

289±17g. Durante o protocolo experimental, os animais foram colocados em grupos de 4 em gaiolas com um ambiente controlado de 22±2°C e 60±5% de humidade relativa com ciclos de luz/escuro 12/12h. Após uma semana de aclimatização, os animais foram aleatoriamente divididos em 4 grupos: controlos sedentários (CONT), controlos exercitados (CONT+E), com tumores da mama (MNU) e com tumores da mama e submetidos a um protocolo de exercício (MNU+E). Para efeitos do presente estudo consideraram-se apenas 4 animais de cada grupo. Este protocolo animal foi aprovado pela Direção Geral de Alimentação e Veterinária (licença nº 008961).

Os animais do grupo MNU foram injetados intraperitonealmente (i.p.) com uma dose única de 50mg/Kg de MNU (ISOPAC, Sigma, Espanha) aos 50 dias de idade, enquanto os animais do grupo controlo foram injetados i.p. com uma dose de veículo de fosfato. Após 48h, os animais dos grupos E iniciaram um programa de treino de endurance (ERTMLD) em tapete rolante (Treadmill Control LE 8710 Harvard Apparatus, USA). Nas primeiras duas semanas a duração e intensidade do treino aumentou gradualmente até 1h/dia, 5dias/semana a uma velocidade de 20m/min, programa que foi mantido durante 35 semanas.

No final do protocolo os animais foram eutanasiados por administração i.p. de quetamina/xilazina (Imalgen® e Rompun®, respetivamente) e recolheu-se o sangue total. Todos os tumores foram contados e removidos para análise histológica. O músculo *gastrocnemius* foi removido, pesado e congelado a -80°C para posterior análise bioquímica.

4. Análise de parâmetros bioquímicos no soro

O sangue foi recolhido para tubos secos e após coagular foi centrifugado a 3000 rpm durante 10 minutos. No soro obtido analisaram-se os parâmetros albumina, triacilglicérideos (TG), creatinina, creatina cinase (CK), proteína total, lactato desidrogenase (LDH) e glucose, em duplicado, num Autoanalisador (PRESTIGE 24i, Cormay PZ). Nas amostras de soro determinaram-se ainda os níveis de miostatina, TWEAK e IL-6 por *slot-blot* como descrito no ponto 7.

5. Preparação de extratos de músculo *gastrocnemius*

Foram preparados extratos de músculo *gastrocnemius* de acordo com o procedimento descrito anteriormente [54], com algumas modificações. Assim, porções

de aproximadamente 50mg de tecido foram homogeneizadas em 1mL de tampão de homogeneização (50mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 0,1% Triton X-100, 10mM PMSF, inibidores de fosfatases (P0044 e P5726, Sigma), a pH 7.5). Os extratos obtidos foram divididos em alíquotas e conservados a -80°C para posteriores análises bioquímicas.

6. Determinação da concentração de proteína total

A concentração de proteína total nos extratos de músculo *gastrocnemius* foi determinada pelo método comercial RC-DC (Bio-Rad, USA), que se baseia no método de Lowry [55]. A 5µL de cada uma das amostras e de soluções de albumina sérica bovina (BSA) com diferentes concentrações (na gama de 0,3 a 10,0mg/mL) adicionaram-se 125µL de reagente I, e após agitação no vórtex adicionaram-se 125µL de reagente II. Após centrifugação a 15000g durante 5 min. à temperatura ambiente descartou-se o sobrenadante e adicionou-se novamente 125µL de reagente I e 40µL de reagente II. Procedeu-se novamente a uma centrifugação a 15000g durante 5 min, descartou-se o sobrenadante e procedeu-se à secagem do *pellet* na SpeedVac (SC210A SpeedVac® Plus, Termo Savant). Seguidamente, adicionou-se 50µL de reagente A' (preparado por adição de 30µL de reagente S a 1,5mL de reagente A) e 400µL de reagente B às amostras e aos padrões. Após 15min à temperatura ambiente mediu-se a absorvência das amostras e padrões a 750nm, num leitor de placas (Multiscan 90, ThermoScientific).

7. Análise da expressão proteica por *imunoblotting*

Um determinado volume de amostra correspondente a 40µg de proteína foi diluído 1:2 em tampão de redução (0,2M Tris-HCl, pH 6,8; 10% SDS (w/v); 20% glicerol (v/v); 10mM β-mercaptoetanol; 0,05% azul de bromofenol (w/v)) e incubado a 100°C durante 5 minutos. Amostras reduzidas e desnaturadas de cada um dos grupos experimentais foram aplicadas num gel 12,5% SDS-PAGE, preparado segundo Laemmli [56]. Após a separação, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Whatman®, Protan®) por *electroblotting* a 200mA durante 2h em tampão de transferência (25mM Tris, 192 mM glicina, pH 8,3 e 20% metanol). Para evitar a ligação não específica do anticorpo, a membrana foi bloqueada por incubação numa solução de 5% (m/v) de leite magro em pó ou numa solução de 5% (m/v) de BSA em

TBS-T (100mM Tris pH 8,0, 1,5mM NaCl e 0,5% Tween 20) durante 1h à temperatura ambiente. A membrana foi, posteriormente, incubada com uma solução de anticorpo primário diluído 1:1000 em solução de bloqueamento (anti-atrogina-1, anti-MuRF1, anti-ATP sintase subunidade beta, anti-GAPDH, anti-TRAF6, anti-TWEAK, anti-NF-kB p50, anti-NF-kB p65, anti-GDF8, anti-p38 MAPK, anti-p-Smad3, anti-mTOR ou anti-Akt) durante 2h à temperatura ambiente. Após 3 lavagens de 10 min. com TBS-T, a membrana foi incubada com uma solução de anticorpo secundário *anti-rabbit* ou *anti-mouse* IgG peroxidase, diluído 1:1000 em solução de bloqueamento durante 2h à temperatura ambiente. Finalmente, a membrana foi lavada 3 vezes com TBS-T e incubada durante 5 min com uma solução de quimioluminescência, ECL, de acordo com as instruções do fabricante, seguindo-se da sua exposição a um filme de raio-X. Os filmes, depois de revelados, foram digitalizados num Molecular Imager Gel Doc XR + system (BioRad) e a intensidade das bandas foi determinada com o software ImageLab (version 5.0, Bio-Rad). As densidades óticas obtidas foram expressas em unidades arbitrárias.

Para a detecção do teor de IL-6, miostatina e TWEAK no soro, diluiu-se a amostra de soro 20 vezes em tampão TBS. De seguida pipetaram-se 100µL de cada uma das amostras para os poços de um sistema de *Slot-blot* (Whatman®, Biometra®) com uma membrana de nitrocelulose previamente ativada por passagem numa solução de 10% de metanol. Sob vácuo as proteínas do soro foram adsorvidas à membrana. A imunodeteção foi efetuada como descrito acima para o *western blot* tendo-se utilizado os anticorpos primários anti-IL-6, anti-miostatina e anti-TWEAK.

8. Avaliação da atividade proteolítica através de zimografia

A análise da atividade proteolítica nos extratos de *gastrocnemius* foi efetuada de acordo com o descrito por Caseiro *et al.* [57], com algumas modificações. Em resumo, as proteínas do músculo foram separadas num gel de 10% SDS-PAGE com 0,1% de gelatina como substrato. Um dado volume de amostra correspondente a 40µg de proteína foi incubado, na proporção de 1:2, em tampão de carga (100mM Tris pH 6,8, 5% SDS, 20% glicerol, 0,1% de azul de bromofenol) durante 10 min à temperatura ambiente. Amostras de cada um dos grupos experimentais foram aplicadas nos poços de um gel e separadas sob uma diferença de potencial de 120V durante cerca de 1h e 15min. Após a separação, o gel foi incubado em tampão de renaturação (2,5% Triton X-

100) durante 30min com agitação. Este procedimento foi repetido e seguido de incubação em tampão de desenvolvimento (50mM Tris, 5mM NaCl, 10mM CaCl₂, 1μM ZnCl₂, 0,02% Triton X-100, pH 7.4) durante 30min. Procedeu-se a uma incubação em tampão de desenvolvimento a 37°C durante 12h. O gel de zimografia foi corado com uma solução de azul de Coomassie G250 (0,4% (m/v) *Coomassie blue* em 50% etanol e 10% ácido acético) durante 3h e foi, de seguida, descorado com uma solução de 25% etanol e 5% ácido acético. O gel obtido foi digitalizado no *Molecular Imager Gel Doc XR+System*.

9. Análise Estatística

As variáveis estudadas apresentaram uma distribuição normal, de acordo com o teste de Kolmogorov-Smirnov pelo que os resultados apresentados foram analisados recorrendo a testes estatísticos paramétricos. As diferenças entre grupos foram analisadas recorrendo a uma análise de variância multifatorial One-way ANOVA seguida do teste *Tukey post-hoc*. Os resultados de todas as variáveis são apresentadas como média ± desvio padrão.

Resultados

1. Caracterização da resposta dos animais à administração de MNU e/ou à prática de ERTMLD

As primeiras lesões mamárias induzidas pela administração de MNU foram detetadas 10 semanas após a administração do carcinogénico. No entanto, os animais dos grupos MNU apresentaram lesões mamárias a tempos diferentes no decorrer do protocolo animal. Não se detetou uma diminuição do consumo de alimento pela administração de MNU. No final do protocolo experimental verificou-se uma diminuição de aproximadamente 7% do peso corporal nos animais do grupo MNU. No entanto, a resposta dos animais ao carcinogénico não foi uniforme com 60% dos animais a manifestarem uma perda de peso corporal superior a 5% e destes 25% evidenciaram uma perda de peso corporal superior a 10%. O programa de exercício físico de reduzida tensão mecânica e de longa duração promoveu uma redução em 10% da percentagem de animais com perda de peso superior a 5%.

Para o presente estudo consideraram-se 4 animais de cada um dos grupos experimentais e no grupo MNU incluíram-se 4 animais que perderam mais de 5% do peso corporal. Os 4 animais do grupo MNU+E foram selecionados aleatoriamente. Pela análise da tabela 1 pode-se observar que a prática de exercício de RTMLD nos animais saudáveis promoveu um aumento de peso corporal de 2% (CONT+E vs. CONT) enquanto nos animais MNU o aumento de peso corporal observado foi de 7% (MNU+E vs. MNU). Relativamente à massa do músculo *gastrocnemius*, a mesma diminuiu nos

animais MNU quando comparados com os animais saudáveis em cerca de 9% ($p < 0,05$ CONT vs. MNU). A prática de ERTMLD promoveu alterações significativas na massa do músculo *gastrocnemius* dos animais saudáveis. No entanto, nos animais MNU observou-se um aumento de cerca de 10% ($p < 0,05$ MNU+E vs. MNU). Não se observaram diferenças do rácio massa de *gastrocnemius*/peso corporal com a prática de ERTMLD nos animais saudáveis.

Tabela 1- Caracterização dos animais dos diferentes grupos em termos de peso corporal, da massa do músculo *gastrocnemius* bem como do rácio massa de *gastrocnemius*/peso corporal.

Grupos experimentais	peso corporal (g)	massa <i>gastrocnemius</i> (g)	Rácio massa <i>gastrocnemius</i> /peso corporal ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)
CONT	288,2±4,7	3,979±0,116 [#]	13,8±0,2
MNU	274,5±2,0	3,638±0,108 ^φ	13,2±0,4
CONT+E	294,9±5,7	3,957±0,239	13,8±0,4 ^φ
MNU+E	294,5±27,7	4,001±0,416	12,1±2,3

Os valores são expressos em média ± desvio padrão.

[#] $p < 0,05$ vs. MNU; ^φ $p < 0,05$ vs. MNU+E

As alterações de peso corporal e da massa muscular promovidas pela administração de MNU e/ou pela prática de exercício físico foram acompanhadas por alterações dos níveis de marcadores séricos. Pela análise da tabela 2 é possível verificar que os níveis de albumina e TG encontram-se tendencialmente diminuídos nos animais do grupo MNU relativamente aos animais do grupo CONT e a prática de ERTMLD não promoveu alterações significativas nestes parâmetros. Os níveis de proteína total e de glucose aumentaram significativamente no grupo MNU comparativamente ao grupo CONT ($p < 0,0001$ CONT vs. MNU, $p < 0,05$ CONT vs. MNU, respetivamente) e a prática de exercício de RTMLD promoveu uma diminuição significativa destes dois parâmetros nos animais MNU ($p < 0,0001$ MNU vs. MNU+E relativamente à PT, $p < 0,05$ MNU vs. MNU+E relativamente à glucose). Os níveis de CK mostraram-se significativamente diminuídos no grupo MNU relativamente ao grupo controlo ($p < 0,0032$ CONT vs. MNU) e os de LDH também diminuíram, embora sem significado estatístico, no grupo MNU relativamente ao grupo controlo. A prática de ERTMLD noa

animais administrados com MNU aumentou significativamente estes parâmetros ($p < 0,0001$ MNU vs. MNU+E).

Tabela 2- Efeito da administração de MNU e/ou da prática de exercício de RTMLD no perfil bioquímico do soro dos animais em estudo.

Parâmetros séricos							
Grupos Experimentais	Albumina (g/L)	TG (mg/dL)	Creatitina (mg/dL)	CK (U/L)	PT (g/L)	LDH (U/L)	Glucose (mg/dL)
CONT	40,6±0,9 ^φ	58,9±14,3 ⁺	0,43±0,06 ⁺	333,0±63,3 ^{###}	63,4±3,1 ^{###}	386,0±99,7	230,4±84,1 [#]
MNU	36,9±2,0	55,0±3,0	0,42±0,06	75,5±68,6 ^{φφφ}	181,4±108,1 ^{φφφ}	313,5±81,7 ^{φφφ}	348,3±25,0 ^φ
CONT+E	40,5±3,0	41,0±13,7	0,50±0,03	296,3±81,6	61,3±3,6	458,2±101,0	286,9±36,5
MNU+E	35,1±6,4	52,4±8,2	0,44±0,03	460,1±233,7	54,4±10,0	776,7±174,0	248,2±97,1

Os valores são expressos em média ± desvio padrão.

[#] $p < 0,05$ vs. MNU, ^{##} $p < 0,01$ vs. MNU, ^{###} $p < 0,0001$ vs. MNU

⁺ $p < 0,05$ vs. CONT+E

^φ $p < 0,05$ vs. MNU+E, ^{φφφ} $p < 0,0001$ vs. MNU+E

Paralelamente, observaram-se alterações nos níveis de citocinas catabólicas e pró-inflamatórias. Os animais do grupo MNU apresentaram níveis de miostatina significativamente aumentados relativamente aos animais do grupo CONT ($p < 0,0001$ CONT vs. MNU). A prática de ERTMLD não promoveu alterações significativas no teor de miostatina nos animais com tumores da mama nem nos animais saudáveis. Os níveis da citocina pró-inflamatória TWEAK também aumentaram significativamente nos animais do grupo MNU comparativamente com os animais do grupo CONT ($p < 0,0001$ CONT vs. MNU). No entanto, a prática de ERTMLD preveniu o aumento de TWEAK nos animais injetados com MNU ($p < 0,0001$ MNU vs. MNU+E). Nos animais saudáveis não se observaram alterações dos níveis séricos de TWEAK associadas à prática de exercício. Curiosamente, não se observaram diferenças significativas da citocina pró-inflamatória IL-6, embora se tenha observado um aumento tendencial nos animais MNU relativamente aos animais CONT.

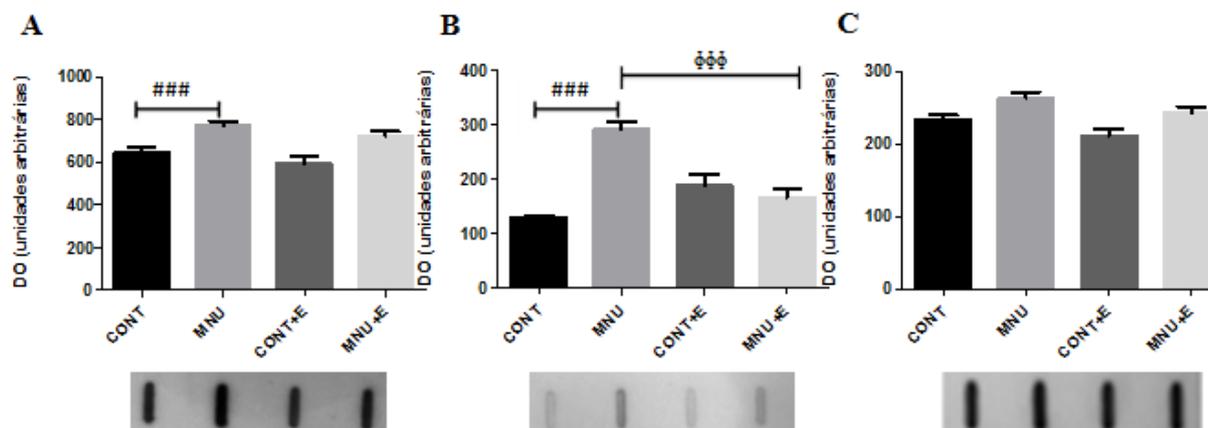


Figura 11- Efeito do MNU e/ou do ERTMLD na expressão dos parâmetros séricos miostatina (A), TWEAK (B) e IL-6 (C) avaliada por *slot blot*. Imagens representativas dos imunoblots são apresentadas abaixo dos respectivos gráficos.

p<0,0001 vs. MNU

φφφ p<0,0001 vs. MNU+E

2. Avaliação do perfil metabólico muscular esquelético em resposta à administração de MNU e/ou à prática de ERTMLD

A expressão das enzimas metabólicas ATP sintase (subunidade β) e da GAPDH foi determinada nos extratos de músculo *gastrocnemius* dos diferentes grupos experimentais por imunoblotting. Os resultados obtidos evidenciaram um aumento significativo da expressão da subunidade beta da ATP sintase em resposta ao exercício físico (p<0,0001 CONT+E vs. CONT, p<0,0001 MNU+E vs. MNU; figura 12A). Não se observaram diferenças significativas de expressão de GAPDH entre os diferentes grupos experimentais (figura 12B). A análise da razão ATP sintase/GAPDH sugere um aumento da capacidade oxidativa do músculo *gastrocnemius* em resposta ao exercício físico praticado ao longo da vida (figura 12C).

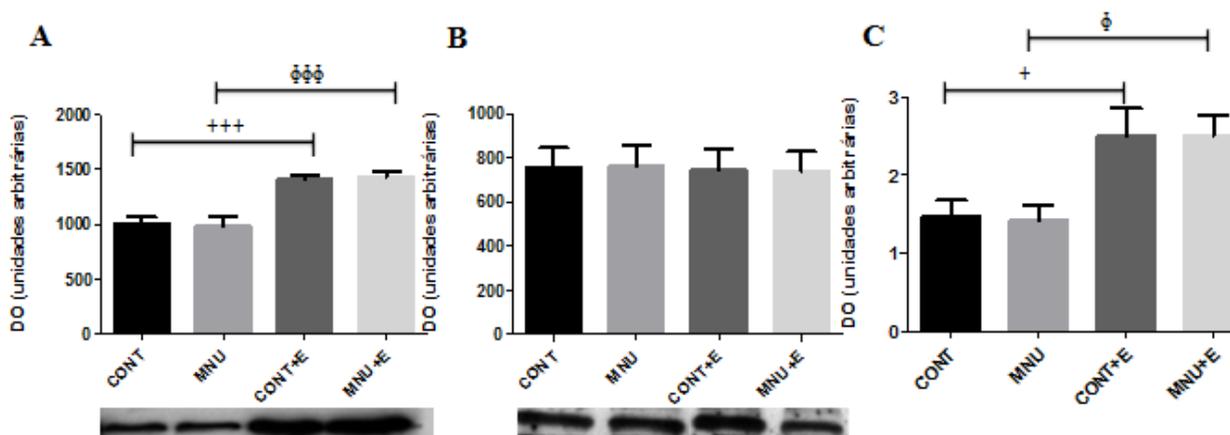


Figura 12- Efeito da administração de MNU e/ou do ERTMLD na expressão da subunidade beta de ATP sintase (A), de GAPDH (B) do músculo *gastrocnemius* avaliada por *western blotting*, e da razão ATP sintase/GAPDH (C). Imagens representativas dos imunoblots são apresentadas abaixo dos respectivos gráficos.

⁺ p<0,05 vs. C+E, ⁺⁺⁺ p<0,0001 vs. CONT+E

^φ p<0,05 vs. MNU+E, ^{φφφ} p<0,0001 vs. MNU+E

3. Avaliação do catabolismo muscular em resposta à administração de MNU e/ou à prática de ERTMLD

O efeito da administração de MNU e/ou da prática de ERTMLD no perfil proteolítico global do músculo *gastrocnemius* foi avaliada por zimografia com gelatina como substrato. Nesta análise apenas se detetou uma banda com atividade proteolítica e, como se pode ver na figura 13, praticamente não se detetaram alterações de atividade entre os diferentes grupos experimentais.

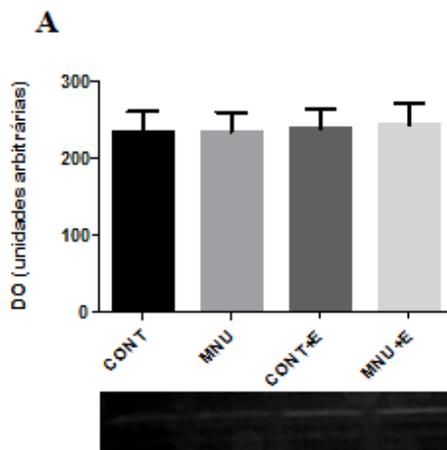


Figura 13- Efeito da administração de MNU e/ou da prática de exercício físico na atividade proteolítica muscular esquelética. Abaixo do gráfico é apresentada uma imagem representativa da banda (de ~60kDa) com atividade detetada no gel de zimografia.

A zimografia com gelatina como substrato permite detetar metaloproteinases (MMPs), o que foi previamente confirmado incubando os géis numa solução contendo 10mM de EDTA. Atendendo ao peso molecular da banda com atividade pode-se suspeitar da presença de MT-MMP1 (também designada de MMP14) que, no músculo esquelético, tem sido envolvida na formação de miotubos e na manutenção da integridade das miofibras [58,59].

No sentido de melhor compreender as vias de sinalização responsáveis pelo catabolismo muscular esquelético induzido pelos tumores da mama e de que forma a prática de ERTMLD as regula, no presente estudo analisaram-se as principais vias reguladas pela miostatina, TWEAK e a via da ubiquitina/proteassoma.

3.1. Via da miostatina

A miostatina é conhecida por ser um modulador positivo de atrofia muscular esquelética sendo que o aumento da sua expressão induz a proteólise de proteínas miofibrilares. De modo a estudar os efeitos da administração de MNU e da prática de ERTMLD nesta via, avaliou-se a expressão da miostatina, da Smad3 e da p38 MAPK, por *western blotting* no músculo *gastrocnemius*. Como se pode constatar pela análise da figura 14A, os níveis de miostatina no músculo *gastrocnemius* aumentaram significativamente nos animais do grupo MNU relativamente aos animais do grupo CONT ($p < 0,01$ CONT vs. MNU). A prática de ERTMLD nos animais saudáveis não

promoveu alterações significativas do teor de miostatina muscular, enquanto nos animais com tumores da mama o exercício contrariou o aumento induzido pelo tumor mas sem significado estatístico. Relativamente aos níveis de p38 MAPK, um mediador da via não canónica, não se observaram diferenças significativas no teor desta cinase (figura 14B). A expressão de p-Smad3, um mediador da via canónica, aumentou no músculo dos animais do grupo MNU, embora sem significado estatístico, e a prática de exercício físico promoveu uma diminuição do seu teor nos animais com tumores da mama, apesar de não ter significado estatístico.

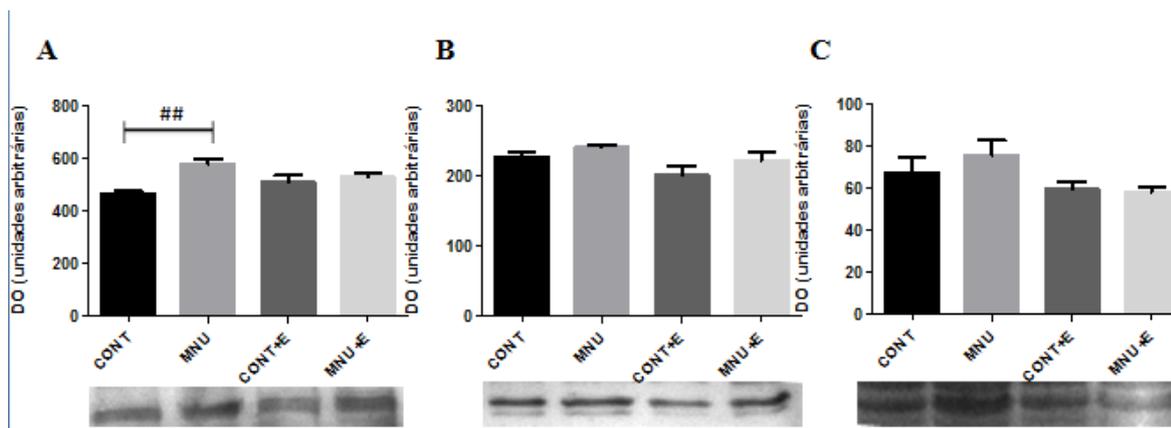


Figura 14- Efeito da administração de MNU e/ou da prática de ERTMLD na expressão de miostatina (A), de p38 MAPK (B) e de p-Smad3 (C) avaliada por *western blotting* no músculo *gastrocnemius*. Imagens representativas dos imunoblots obtidos são apresentadas abaixo dos gráficos.

p<0,01 vs. MNU

3.2. Via da TWEAK

A TWEAK é uma citocina da família TNF e atua na fibra muscular via NF-kB. Com vista a estudar a associação entre os tumores da mama, induzidos pela administração de MNU, e da prática de ERTMLD na regulação desta via, determinou-se os níveis de TWEAK, p50 e p65 no músculo *gastrocnemius* por *western blotting*. Como se pode verificar pela análise da figura 15, não se observaram diferenças significativas da expressão destes mediadores sugestivas da contribuição desta via para as alterações de massa muscular observadas.

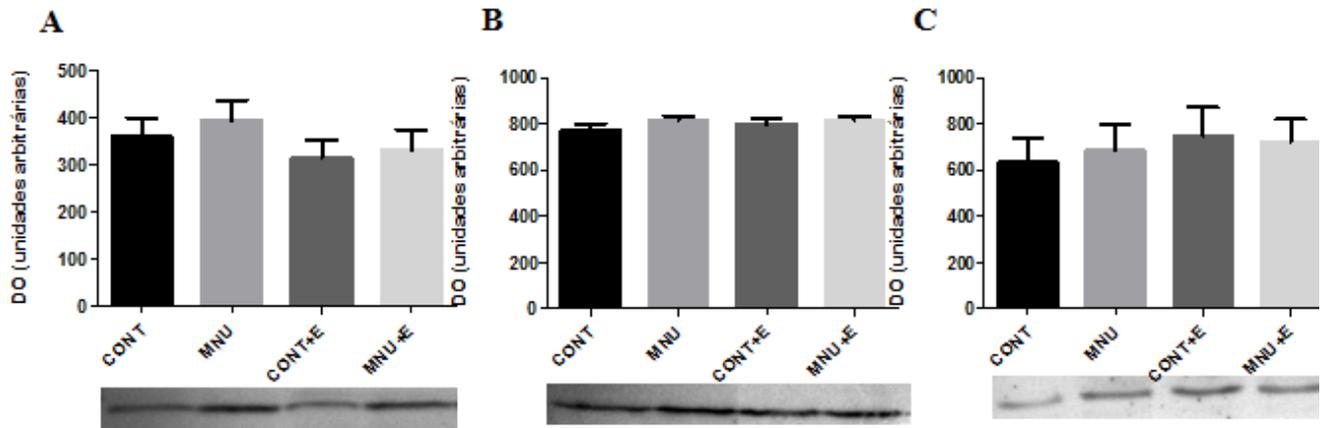


Figura 15- Efeito da administração de MNU e/ou da prática de ERTMLD na expressão de TWEAK (A), de p50 (B) e de p65 (C) avaliada por *western blotting* no músculo *gastrocnemius*. Imagens representativas dos imunoblots obtidos são apresentadas abaixo dos gráficos.

3.3. Via da ubiquitina/proteassoma

De forma a avaliar a contribuição da via da ubiquitina/proteassoma para o catabolismo muscular associado ao cancro da mama e o efeito da prática de ERTMLD na modulação desta via avaliou-se a expressão das enzimas E3 ligases MuRF-1, atrogina-1 e TRAF-6 no *gastrocnemius* por *western blotting*. Como se pode constatar pela análise da figura 16 não se observaram diferenças significativas da expressão de MuRF-1 e TRAF6 no músculo dos animais com tumores da mama e a prática de exercício de RTMLD também não promoveu alterações significativas dos níveis destas E3 ligases. No entanto, nos animais do grupo MNU observou-se um aumento significativo do teor muscular de atrogina-1 relativamente aos animais do grupo CONT ($p < 0,05$ CONT vs. MNU) e a prática de exercício físico ao longo da vida preveniu este aumento ($p < 0,05$ MNU vs. MNU+E).

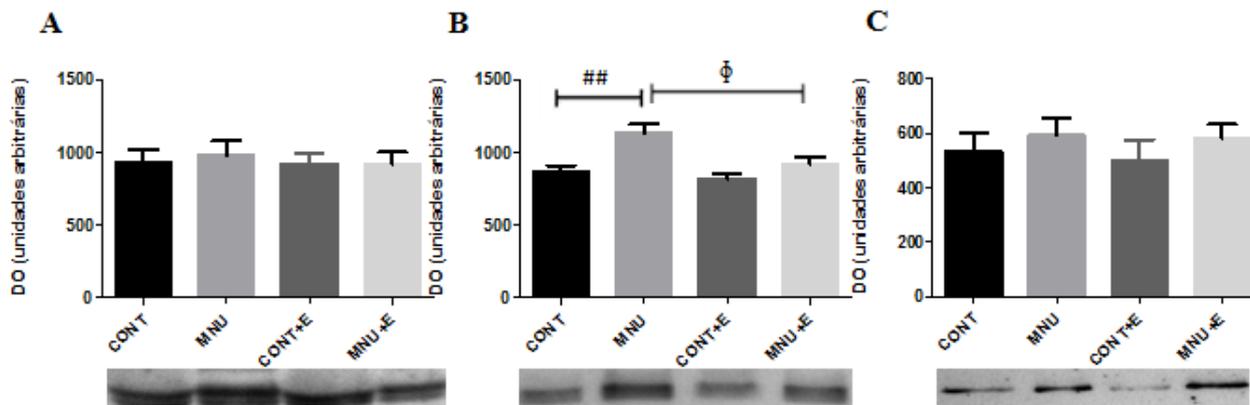


Figura 16- Efeito da administração de MNU e/ou da prática de ERTMLD na expressão de MuRF-1 (A), de atrogina-1 (B) e de TRAF6 (C) avaliada por *western blotting* no músculo *gastrocnemius*. Imagens representativas dos imunoblots obtidos são apresentadas abaixo dos gráficos.

$p < 0,05$ vs. MNU; ϕ $p < 0,05$ vs. MNU+E

4. Impacto da administração de MNU e/ou da prática de ERTMLD na síntese proteica no músculo esquelético

A via Akt/mTOR é uma via de sinalização anabólica que quando ativada promove o aumento da área de seção transversal das fibras musculares. De modo a avaliar a contribuição desta via na resposta muscular esquelética ao cancro da mama e à prática de ERTMLD determinou-se o teor das proteínas Akt e mTOR em extratos de músculo *gastrocnemius* por *western blotting*. Como se pode constatar pela análise da figura 17A os animais do grupo MNU apresentaram uma diminuição dos níveis de mTOR, embora não significativa, e a prática de exercício de RTMLD nos animais com tumores da mama promoveu um aumento significativo do teor muscular desta cinase ($p < 0,01$ MNU vs. MNU+E). A prática de ERTMLD não induziu alterações significativas dos níveis de mTOR nos animais saudáveis. Relativamente aos níveis de Akt muscular, apesar de se ter observado um aumento no músculo esquelético dos animais com tumores da mama submetidos a um programa de ERTMLD, este não foi estatisticamente significativo (figura 17B).

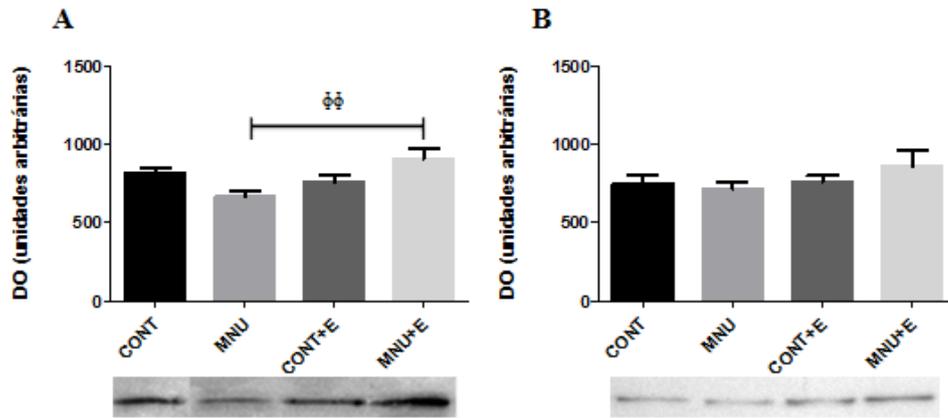


Figura 17- Efeito da administração de MNU e/ou da prática de ERTMLD na expressão de mTOR (A) e de Akt (B) avaliada por *western blotting* no músculo *gastrocnemius*. Imagens representativas dos imunoblots obtidos são apresentadas abaixo dos gráficos

$\phi\phi$ $p < 0,01$ vs. MNU+E

Discussão

O cancro da mama constitui um dos tipos de cancro mais incidente na mulher. Nos Estados Unidos, 29% dos novos casos de cancro diagnosticados em 2013 e 14% dos óbitos registados nesse ano foram devidos a cancro de mama [60]. No entanto, os avanços tecnológicos nos meios de diagnóstico e no próprio tratamento aumentaram para cerca de 80% a taxa de sobrevivência destes pacientes [61]. O risco/ suscetibilidade de desenvolver cancro da mama é dependente de vários fatores de risco, nomeadamente a idade (mulheres na faixa etária dos 30-39 têm uma probabilidade de cerca de 0,04%/ano e mulheres acima dos 80 anos apresentam um risco maior, cerca de 10%/ano [62]), estilo de vida (por exemplo dieta, consumo de álcool e tabaco), antecedentes de patologia benigna da mama, exposição a agentes carcinogénicos exógenos entre outros [63,64]. Cerca de 30 a 40% dos pacientes com cancro da mama apresentam caquexia, uma síndrome paraneoplásica complexa e multifatorial [1,2,5,8,10,11]. O exercício físico de reduzida tensão mecânica e de longa duração, geralmente designado de exercício de endurance, parece melhorar o catabolismo muscular subjacente à caquexia associada ao cancro porque está envolvido na sub-regulação da atividade de citocinas pró-inflamatórias, promove um efeito antioxidante ao estimular a atividade de enzimas antioxidantes com consequente atenuação dos níveis de ROS, que por sua vez, está relacionada com a diminuição da atividade da via ubiquitina/proteassoma [27,28,47], e por isso, tem sido sugerido como uma abordagem terapêutica não farmacológica com potenciais efeitos benéficos para o doente oncológico em risco de desenvolver caquexia.

No sentido de melhor caracterizar bioquimicamente a caquexia associada ao cancro e de avaliar o impacto da prática de exercício físico na regulação desta síndrome, no presente estudo foi utilizado um modelo animal de cancro da mama induzido quimicamente pela administração de uma dose única de 1-metil-1-nitrosureia (MNU) a animais com 50 dias de idade. Este modelo animal reproduz a doença em humanos permitindo o estudo dos mecanismos bioquímicos subjacentes e é relativamente fácil de manter em laboratório apesar de envolver protocolos longos [65,66]. As lesões mamárias induzidas pelo MNU têm características específicas como natureza agressiva e invasiva localmente, semelhantes às encontradas em humanos [65,66]. Utilizando este modelo animal verificou-se que efetivamente a administração de MNU induziu o desenvolvimento de lesões mamárias, as primeiras das quais foram detetadas 10 semanas após a injeção do carcinogénico. Em cerca de 60% destes animais verificou-se um decréscimo significativo de peso corporal e de perda de massa do músculo *gastrocnemius* de cerca de 5% e 9%, respetivamente, quando comparados com os animais saudáveis nas mesmas condições experimentais (alimentação, temperatura, humidade relativa e ciclos de luz/escuro), uma incidência mais elevada do que a observada em mulheres com cancro da mama [10]. Estes resultados suportam a presença de caquexia associada ao cancro (perda de cerca de 5% do peso num período inferior a 12 meses [13]) neste modelo animal, devida, pelo menos em parte, ao catabolismo muscular esquelético. A prática de exercício de reduzida tensão mecânica e longa duração (ERTMLD) nos animais submetidos à administração de MNU promoveu uma redução em 10% da percentagem de animais com catabolismo muscular esquelético, sugerindo que o protocolo de treino adotado no presente estudo exerceu um efeito anabólico a nível muscular.

As citocinas secretadas pelas células inflamatórias constituem mediadores humorais com um papel importante na caquexia associada ao cancro [2,4,12]. No presente estudo verificou-se um aumento significativo de citocinas séricas pró-inflamatórias, como a TWEAK, e catabólicas, como a miostatina, nos animais do grupo MNU (figura 12), a par de uma diminuição dos níveis séricos de albumina (tabela 2), o que corrobora o perfil inflamatório e/ou catabólico subjacente à caquexia associada ao cancro [7,11,12]. A diminuição tendencial do teor de albumina nos animais do grupo MNU sugere a ocorrência de uma resposta hepática de fase aguda, o que suporta estudos anteriores [5,7,10,11,12,16,17]. Níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias estão ainda

associados à indução de proteólise muscular, à indução da lipólise e/ou inibição da lipogênese respectivamente e ainda à inibição da absorção de glucose pelo músculo esquelético [2,4,11,12,15,19,67,68]. O aumento dos níveis séricos de glucose verificado nos animais com lesões mamárias sugere que esta é menos absorvida pelo músculo esquelético. A prática de ERTMLD ao longo da vida preveniu o aumento dos níveis séricos da citocina pró-inflamatória TWEAK, dos níveis de proteína total e de glucose nos animais com tumores da mama. Os níveis séricos de albumina e triacilglicerídeos praticamente não foram influenciados pela prática deste tipo de exercício (tabela 2). O ERTMLD tem sido descrito como tendo uma ação anti-inflamatória e a nível muscular esquelético estimula a expressão de genes que codificam para a GLUT-1 aumentando a absorção de glucose pelo músculo esquelético [9,28,47]. Ao nível deste tecido verificou-se que o ERTMLD promoveu um aumento do metabolismo oxidativo (figura 12C) que se manifestou pelo aumento da expressão de ATPsintase β . Efetivamente, este tipo de exercício está associado a um aumento da atividade mitocondrial na fibra muscular esquelética por aumento do número e função das mitocôndrias, do *status* antioxidante e ainda pela diminuição da produção de ROS [41].

No sentido de relacionar as alterações sistémicas associadas aos tumores da mama e/ou à prática de exercício físico ao longo da vida com as alterações de massa muscular, a nível muscular esquelético estudaram-se as vias reguladas pela miostatina e pelo TWEAK, e o seu impacto na proteólise mediada pela via da ubiquitina/proteassoma e na via hipertrófica Akt/mTOR. A miostatina tem sido apontada como um regulador negativo do desenvolvimento muscular e parece regular negativamente a expressão de genes que codificam proteínas miofibrilares tais como a MyoD e a miogenina, por ativação da via UPP, promovendo o aumento da expressão de atrogina-1, numa via independente de NF-kB, e/ou pela inibição da via hipertrófica Akt/mTOR [24,69]. Estudos revelaram que o silenciamento do gene que codifica para a miostatina promove um aumento da massa muscular em ratos por hiperplasia e hipertrofia. No entanto, o aumento de tamanho da fibra não é acompanhado de um aumento da capacidade de produção de força, sugerindo que a inibição da miostatina não regula corretamente a expressão e funcionalidade de proteínas contráteis [69]. No presente estudo, verificou-se que os níveis de miostatina no soro e no músculo esquelético estão significativamente aumentados nos animais do grupo MNU quando comparados com os animais saudáveis. A mesma tendência foi observada para a p38 MAPK, um mediador da via não canónica

da miostatina, e para Smad3, um mediador da via canónica, embora sem significado estatístico. A prática de ERTMLD não promoveu alterações na regulação desta via nos animais com lesões mamárias (figura 14). Estudos sobre o efeito do exercício físico na regulação desta via não são consensuais, pelo que este depende do tipo de músculo e do tipo de exercício praticado [70]. Alguns estudos registaram uma diminuição da expressão de miostatina no músculo esquelético após a prática de exercício de ETMCD ao longo de várias semanas ou até mesmo após exercício agudo [70,71,72,73].

O aumento do teor da citocina TWEAK, pertencente à família TNF- α , tem sido associado a doenças malignas, como o cancro da mama, e é responsável por estimular, indiretamente, a transcrição de genes que codificam, entre outros, E3 ligases envolvidas na ativação do proteassoma 26S [21,24,30,74]. Um grupo de investigadores tratou ratos como TWEAK tendo observado uma redução significativa do peso corporal e da massa muscular esquelética bem como da área de seção transversal das fibras [75]. Neste trabalho, o aumento dos níveis séricos de TWEAK nos animais do grupo MNU relacionou-se com a perda de peso corporal e de massa de *gastrocnemius*. No entanto, a nível muscular o aumento do teor desta citocina não foi estatisticamente significativo quando comparado com o grupo CONT (figura 15A).

As citocinas pró-inflamatórias (TWEAK, IL-6, TNF- α) induzem a fosforilação, ubiquitinação e degradação proteolítica das IKBs, libertando o NF-kB do complexo NF-kB/IKBs para ser translocado para o núcleo onde vai regular a transcrição uma série de genes efetores [76,77,78,79]. Evidências em humanos e roedores sugerem que a formação do heterodímero p50/p65 possui um papel importante na ativação da via NF-kB em células musculares esqueléticas [76,79]. O NF-kB constitui uma família de fatores de transcrição que regulam a transcrição de mais de 150 genes envolvidos nas mais variadas respostas celulares. Desta família fazem parte 5 membros: p105/p50, p100/p52, p65 (RelA), RelB e c-Rel, que possuem homologia no domínio Rel que lhes permite dimerizar e serem translocados para o núcleo [76]. A ativação do NF-kB tem sido sugerida como essencial na proteólise muscular em humanos e roedores [75] por promover o aumento da expressão de atrogina-1, MuRF1, miostatina, MMP-9 e pela diminuição da expressão de MyOD [76,77]. No entanto, os resultados obtidos não suportam o envolvimento desta via no catabolismo muscular associado ao cancro uma vez que não se observaram diferenças na expressão das subunidades p50 e p65 do NF-kB. Rhoads *et al.* [80] avaliaram a expressão nuclear de p50, p65, bcl-3, fosfo-p65 e Ikb α no músculo esquelético de humanos com cancro gástrico e também não

verificaram alterações dos níveis de p50, p65 e Bcl-3 mas observaram um aumento significativo de fosfo-p65 e uma diminuição da expressão de I κ B α . A prática de ERTMLD preveniu o aumento dos níveis séricos de TWEAK nos animais com lesões mamárias mas a nível muscular não exerceu efeito na regulação dos níveis das subunidades p50 e p65 do NF-kB (figura 15), ao contrário do observado por outros autores em ratos após 12 semanas de exercício em tapete rolante [79]. A ativação desta via foi associada ao aumento dos níveis de ROS promovido pelo exercício físico com consequente incremento da expressão da MnSOD [78,81]. A redução dos níveis séricos de TWEAK promovida pelo exercício físico (figura 15) poderá estar relacionada com os diferentes graus de malignidade dos tumores entre os grupos MNU e MNU+E dado que parece haver uma correlação entre o teor desta citocina e as alterações histológicas do tumor [82]. Efetivamente, resultados do nosso grupo de investigação sugerem haver menos lesões malignas da mama nas fêmeas injetadas com MNU mas fisicamente ativas (dados ainda não publicados).

De modo a estudar a contribuição da via ubiquitina/proteassoma para o catabolismo muscular esquelético avaliaram-se os teores musculares de três enzimas E3 ligases, a MuRF-1, a atrogina-1 e a TRAF6. Apesar dos níveis destas enzimas terem aumentado no *gastrocnemius* dos animais do grupo MNU, apenas se verificaram diferenças estatisticamente significativas para a atrogina-1 (figura 16). O facto de não se terem observado diferenças significativas nos níveis de TWEAK e de NF-kB a nível muscular nos animais do grupo MNU parece justificar os resultados observados para a expressão de MuRF1 e de TRAF-6, uma vez que o NF-kB regula a transcrição destas ligases. Os fatores de transcrição FoxO são também responsáveis pela regulação da transcrição dos atrogenes MuRF1 e atrogina-1. Assim, a sua transcrição é modulada positivamente pelo fator FoxO3 e negativamente pelo Akt [16,23,24,38,39]. No presente estudo observou-se uma diminuição, ainda que sem significado estatístico, dos níveis de Akt no *gastrocnemius* dos animais do grupo MNU (figura 17B) o que poderá justificar, pelo menos em parte, o aumento de atrogina-1. A prática de ERTMLD pelos animais com tumores mamários preveniu o aumento da expressão de atrogina-1 e promoveu o aumento dos níveis de Akt (figuras 16 e 17). A cinase Akt pertencente à via Ak/mTOR e é responsável por ativar a cascata de eventos que culmina na transcrição de proteínas envolvidas na reciclagem ribossomal e na iniciação do processo de síntese proteica através da ligação da subunidade 40S do ribossoma à terminação 5' do mRNA, via ativação da mTOR (envolvida na proliferação e sobrevivência celulares) e ainda por

inibir a transcrição de atrogenes, via fosforilação dos fatores FoxO [16,23,24,38,39]. A via hipertrófica foi estudada no presente estudo pela avaliação da expressão das proteínas mTOR e Akt. Ambas as cinases apresentaram níveis inferiores no músculo esquelético dos animais do grupo MNU comparativamente ao grupo CONT, embora sem significado estatístico. A prática de ERTMLD promoveu um aumento do teor muscular destas cinases nos animais com tumores da mama, embora apenas estatisticamente significativo para a mTOR (figura 17). Contrariamente ao EETMCD (comumente designado de exercício de resistência) que promove o aumento da síntese proteica com ativação da via Akt/mTOR [28,46], tem sido descrito que o ERTMLD contribui de forma indireta para o aumento da área de seção transversal da fibra, inibindo a via da ubiquitina/proteassoma, contrariando a inibição da via Akt/mTOR [28,46]. Os resultados do presente estudo sugerem que o protocolo de exercício implementado promoveu a ativação da via Akt/mTOR nos animais com tumores da mama, exercendo um efeito anabólico.

De forma a melhor integrar os resultados obtidos neste trabalho, na figura 18 estão representadas as vias moduladas no músculo *gastrocnemius* pelos tumores da mama e/ou pela prática de ERTMLD.

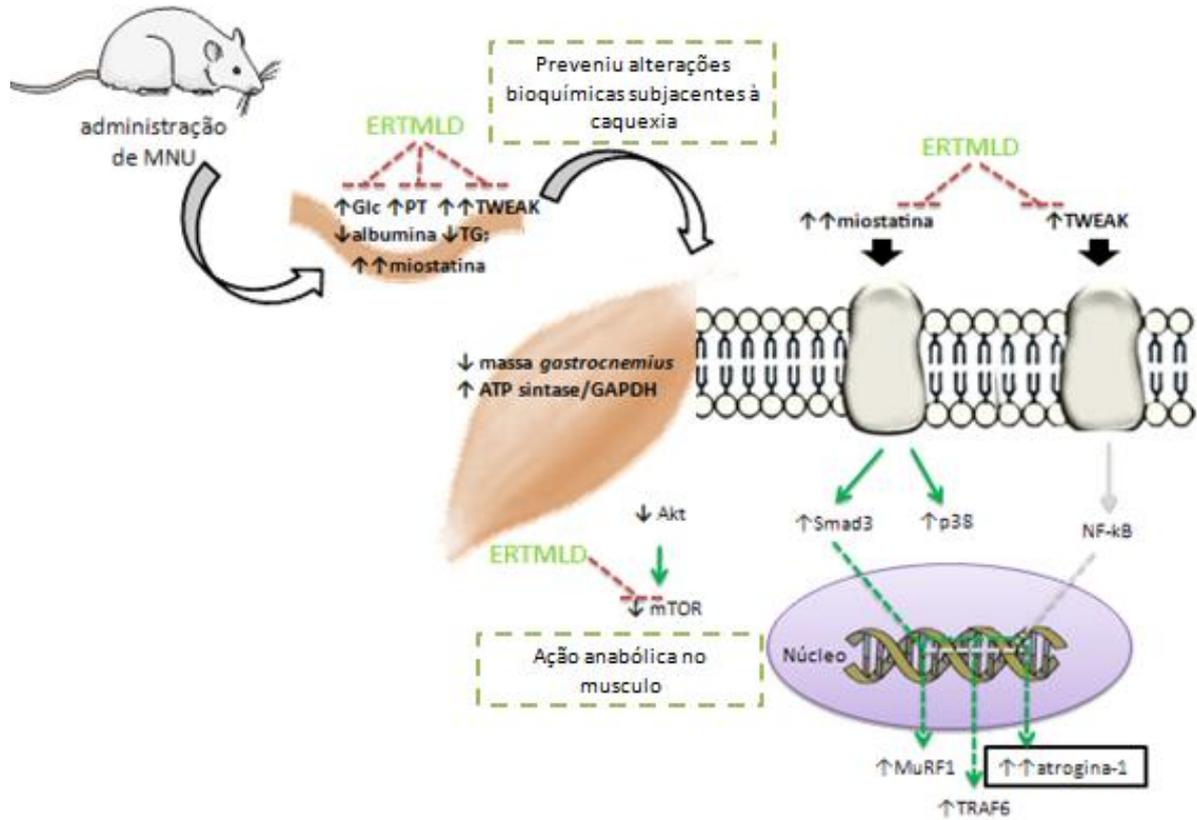


Figura 18- Esquema integrativo das vias moduladas e alterações metabólicas promovidas pela administração de MNU e/ou da prática de ERTMLD e o seu resultado em termos de regulação da massa do músculo *gastrocnemius*. As proteínas assinaladas com duas setas (↑↑) são as que se encontraram significativamente aumentadas no grupo MNU e com uma seta apenas (↑) estão assinaladas as proteínas em que se observou um aumento da expressão embora sem significado estatístico.

Conclusões

No sentido de avaliar a influência do cancro da mama e/ou da prática de ERTMLD ao longo da vida no perfil sérico de marcadores catabólicos e inflamatórios e na regulação da massa muscular esquelético, foi desenhado um protocolo experimental com um modelo animal de cancro da mama induzido quimicamente e os resultados obtidos permitiram tirar as seguintes conclusões:

- i) A administração de MNU resultou num decréscimo de peso corporal e da massa do músculo *gastrocnemius* sugestiva de atrofia muscular esquelética. A prática de ERTMLD nos animais injetados com MNU preveniu o catabolismo muscular em 10% dos animais.
- ii) As alterações dos parâmetros bioquímicos séricos proteína total, albumina, glucose e triacilglicerídeos bem como dos níveis de TWEAK e miostatina nos animais do grupo MNU suporta a ocorrência de uma resposta hepática de fase aguda, de alterações metabólicas e de inflamação, característica da caquexia associada ao cancro. A prática de ERTMLD preveniu o aumento sérico de proteína total, de glucose e de TWEAK, o que corrobora a sua ação anti-inflamatória na interação tumor-hospedeiro.

iii) A administração de MNU promoveu a nível muscular esquelético um aumento da proteólise mediada pela miostatina e atrogina-1. A prática de ERTMLD preveniu o aumento da expressão de atrogina-1 e induziu o aumento significativo da expressão de mTOR, o que sugere que o programa de exercício físico estudado teve um efeito anabólico a nível muscular esquelético.

Em geral, os resultados sugerem que a caquexia associada ao cancro da mama se caracteriza por um perfil sérico pró-inflamatório e catabólico que a nível muscular esquelético se reflete num aumento da proteólise. O exercício físico de RTMLD praticado ao longo da vida preveniu as alterações bioquímicas séricas subjacentes à caquexia associada ao cancro e exerceu uma ação anabólica a nível muscular esquelético. Estudos futuros serão importantes para aprofundar a análise das vias de sinalização moduladas na caquexia associada ao cancro e avaliar o efeito de diferentes programas de exercício físico na regulação dessas vias, antevendo a implementação de programas de exercício físico que tenham uma ação preventiva ou terapêutica na caquexia associada ao cancro.

Bibliografia

- [1] Argilés JM, López-Soriano FJ, Toledo M, Betancourt A, Serpe R, Busquets S. The cachexia score (CASCO). A new tool for staging cachectic cancer patients. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle* 2011;2:87-93.
- [2] Argilés JM, Moore-Carrasco R, Fuster G, Busquets S, López-Soriano FJ. Cancer cachexia: the molecular mechanisms *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2003;35:405-09.
- [3] Inui A. Cancer anorexia-cachexia syndrome: current issues in research and management. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 2002; 52:72-91.
- [4] Argilés JM, Busquets S, García-Martínez C, López-Soriano FJ. Mediators involved in the cancer anorexia-cachexia syndrome: past, present, and future. *Nutrition* 2005;21: 977-85.
- [5] Fearon KCH. Cancer cachexia: Developing multimodal therapy for a multidimensional problem. *European Journal of Cancer* 2008;44:1124-32.
- [6] Salomão EM, Toneto AT, Silva GO, Gomes-Marcondes MCC. Physical Exercise and a Leucine-Rich diet modulate the muscle protein metabolism in walker tumor-bearing rats. *Nutrition and Cancer* 2010;62(8):1095-1104.
- [7] Fearon KCH, Glass DJ, Guttridge DC. Cancer cachexia: Mediators, Signaling, and Metabolic Pathways. *Cell Metabolism* 2012;16:153-66.

- [8] Padrão AI, Oliveira P, Vitorino R, Colaço B, Pires MJ, Márquez M, Castellanos E, Neuparth MJ, Teixeira C, Costa C, Moreira-Gonçalves D, Cabral S, Duarte JA, Santos LL, Amado F, Ferreira R. Bladder cancer-induced skeletal muscle wasting: Disclosing the role of mitochondria plasticity. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2013;45:1399-1409.
- [9] Suzuki H, Asakawa A, Amitani H, Nakamura N, Inui A. Cancer cachexia-pathophysiology and management. *Journal of Gastroenterology* 2013;48:574-94.
- [10] Penet MF, Gadiya MM, Krishnamachary B, Nimmagadda S, Pomper MG, Artemov D, Bhujwalla ZM. Metabolic Signatures Imaged in Cancer-Induced Cachexia. *Cancer Research* 2011;71(22):6948-56.
- [11] Tsoli M, Robertson G. Cancer cachexia: malignant inflammation, tumorkines, and metabolic mayhem. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 2013;24(4):174-83.
- [12] Skipworth RJE, Stewart GD, Dejong CHC, Preston T, Fearon KCH. Pathophysiology of cancer cachexia: Much more than host-tumour interaction?. *Clinical Nutrition* 2007; 26:667-76.
- [13] Lenk K, Schuler G, Adams V. Skeletal muscle wasting in cachexia and sarcopenia: molecular pathophysiology and impact of exercise training. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle* 2010;1:9-21.
- [14] Argilés JM, Busquets S, Felipe A, López-Soriano FJ. Molecular mechanisms involved in muscle wasting in cancer and ageing: cachexia versus sarcopenia. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2005;37:1084-1104.
- [15] Argilés JM, Busquets S, López-Soriano FJ. The pivotal role of cytokines in muscle wasting during cancer. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2005;37:1609-19.
- [16] Skipworth RJE, Stewart GD, Ross JA, Guttridge DC, Fearon KCH. The molecular mechanisms of skeletal muscle wasting: Implications for therapy. *Surgeon* 2006;4(5):273-83.
- [17] Vaughan VC, Martin P, Lewandowski PA. Cancer cachexia: impact, mechanisms and emerging treatments. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle* 2013;4:95-109.
- [18] Der-Torossian H, Asher SA, Winnike JH, Wysong A, Yin X, Willis MS, O'Connell TM, Couch ME. Cancer cachexia's metabolic signature in a murine model confirms a distinct entity. *Metabolomics* 2013;9:730-39.

- [19] MacDonald N, Easson AM, Mazurak VC, Dunn GP, Baracos VE. Understanding and Managing Cancer Cachexia. *Journal of the American College of Surgeons* 2003;197(1):143-61.
- [20] Mourtzakis M, Bedbrook M. Muscle atrophy in cancer: a role for nutrition and Exercise. *Applied Physiology, Nutrition and Metabolism* 2009;34: 950-56
- [21] Sato S, Ogura Y, Kumar A. TWEAK/Fn14 signaling axis mediates skeletal muscle atrophy and metabolic dysfunction. *Frontiers in Immunology* 2014;18(5):1-10.
- [22] Otto A, Patel K. Signalling and the control of skeletal muscle size. *Experimental Cell Research* 2010;316:3059-66.
- [23] Romanick M, Thompson LV, Brown-Borg HM. Murine models of atrophy, cachexia and sarcopenia in skeletal muscle. *Biochimica et Biophysica Acta* 2013;1832:1410-20.
- [24] Bonaldo P, Sandri M. Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy. *Disease Models & Mechanisms* 2013;6:25-39.
- [25] Schiaffino S, Dyar KA, Ciciliot S, Blaauw B, Sandri M. Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy. *FEBS Journal* 2013;280:4294-4314.
- [26] Alamdari N, Aversa Z, Castellero E, Hasselgren PO. Acetylation and deacetylation—novel factors in muscle wasting. *Metabolism Clinical and Experimental* 2013; 62:1-11.
- [27] Bonetto A , Penna F, Muscaritoli M , Minero VG, Fanelli FR, Baccino FM, Costelli P. Are antioxidants useful for treating skeletal muscle atrophy?. *Free Radical Biology & Medicine* 2009;47:906-16.
- [28] Gould DW, Lahart I, Carmichael AR, Koutedakis Y, Metsios GS. Cancer cachexia prevention via physical exercise: molecular mechanisms. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle* 2013;4:111-24.
- [29] Sandri M. Protein breakdown in muscle wasting: Role of autophagy-lysosome and ubiquitin-proteasome. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2013;45:2121-29.
- [30] Kumar A, Bhatnagar S, Paul PK. TWEAK and TRAF6 regulate skeletal muscle atrophy *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care* 2012;15(3):233–39.
- [31] Argilés JM, López-Soriano FJ, Busquets S. Apoptosis signalling is essential and precedes protein degradation in wasting skeletal muscle during catabolic conditions. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2008;40:1674-78.

- [32] Fanzani A, Conraads VM, Penna F, Martinet W. Molecular and cellular mechanisms of skeletal muscle atrophy: an update. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle* 2012;3:163-79.
- [33] Glass DJ. Molecular mechanisms modulating muscle mass. *Trends in Molecular Medicine* 2003;9(8):344-50.
- [34] Mittal A, Bhatnagar S, Kumar A, Lach-Trifilieff E, Wauters S, Li H, Makonchuk DY, Glass DJ, Kumar A. The TWEAK–Fn14 system is a critical regulator of denervation-induced skeletal muscle atrophy in mice. *Journal of Cell Biology* 2010; 188(6):833-49.
- [35] Wajant H. The TWEAK-Fn14 system as a potential drug target. *British Journal of Pharmacology* 2013;170:748-64.
- [36] Argilés JM, Orpí M, Busquets S, López-Soriano FJ. Myostatin: more than just a regulator of muscle mass. *Drug Discovery Today* 2012;17:702-09.
- [37] Klimek MEB, Aydogdu T, Link MJ, Pons M, Koniaris LG, Zimmers TA. Acute inhibition of myostatin-family proteins preserves skeletal muscle in mouse models of cancer cachexia. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2010;391:1548-54.
- [38] Sitt TN, Drujan D, Clarke BA, Panaro F, Timofeyeva M, Yancopoulos GD, Glass DJ. The IGF-1/PI3K/Akt Pathway Prevents Expression of Muscle Atrophy-Induced Ubiquitin Ligases by Inhibiting FOXO Transcription Factors. *Molecular Cell* 2004;14:395-403.
- [39] Nader GA. Molecular determinants of skeletal muscle mass: getting the “AKT” together. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2005;37:1985-96.
- [40] Glass DJ. Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signalling pathways. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2005;37:1974-84.
- [41] Quadrilatero J, Alway SE, Dupont-Versteegden EE. Skeletal muscle apoptotic response to physical activity: potential mechanisms for protection. *Applied Physiology, Nutrition and Metabolism* 2011;36:608-17.
- [42] Armand AS, Laziz I, Djeghloul D, Lécolle S, Bertrand AT, Biondi O, Windt LJ, Chanoine C. Apoptosis-inducing factor regulates skeletal muscle progenitor cell number and muscle phenotype. *PLoS ONE* 2011; 6(11): 1-15
- [43] Bennani-Baiti N, Walsh D. Animal models of the cancer anorexia–cachexia syndrome. *Support Care Cancer* 2011;19:1451-63.

- [44] Donatto FF, Neves RX, Rosa FO, Camargo RG, Ribeiro H, Matos-Neto EM, Seelaender M. Resistance exercise modulates lipid plasma profile and cytokine content in the adipose tissue of tumour-bearing rats. *Cytokine* 2013;61:426-32.
- [45] Argilés JM, López-Soriano F, Busquets S. Novel approaches to the treatment of cachexia. *Drug Discovery Today* 2008;13:73-8.
- [46] Chen GQ, Mou CY, Yang YQ, Wang S, Zhao ZW. Exercise training has beneficial anti-atrophy effects by inhibiting oxidative stress-induced MuRF1 upregulation in rats with diabetes. *Life Sciences* 2011;89:44-9.
- [47] El-Kader SMA. Aerobic versus resistance exercise training in modulation of insulin resistance, adipocytokines and inflammatory cytokine levels in obese type 2 diabetic patients. *Journal of Advanced Research* 2011;2:179-83.
- [48] Atherton PJ, Babraj J, Smith K, Singh J, Rennie MJ, Wackerhage H. Selective activation of AMPK-PGC-1 or PKB-TSC2-mTOR signaling can explain specific adaptive responses to endurance or resistance training-like electrical muscle stimulation. *The FASEB Journal* 2005;19:786-88.
- [49] Bloch W, Zopf E, Zimmer P, Baumann FT. Role of physical activity in tumor patients and possible underlying mechanisms. *European Review of Aging and Physical Activity* 2013;10:25-32.
- [50] Atherton PJ, Smith K. Muscle protein synthesis in response to nutrition and exercise. *The Journal of Physiology* 2012;1049-57.
- [51] Lundberg TR, Fernandez-Gonzalo R, Gustafsson T, Tesch PA. Aerobic exercise does not compromise muscle hypertrophy response to short-term resistance training. *Journal of Applied Physiology* 2013;114:81-9.
- [52] Gomez-Cabrera MC, Ferrando B, Briocche T, Sanchis-Gomar F, Viña J. Exercise and antioxidante supplements in the elderly. *Journal of Sport and Health Science* 2013;2:94-100.
- [53] Ferreira F, Ferreira R, Duarte JA. Stress oxidativo e dano oxidativo muscular esquelético: influência do exercício agudo inabitual e do treino físico. *Revista Portuguesa das Ciências do Desporto* 2007;7(2):267-75.
- [54] Nedergaard A, Jespersen JG, Pingel J, Christensen B, Sroczynski N, Langberg H, Kjaer M, Schjerling P. Effects of weeks lower limb immobilization and two separate rehabilitation regimens on gastrocnemius muscle protein turnover signaling and normalization genes. *BMC Research Notes* 2012;166(5):1-11

- [55] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 1951;1:265-75.
- [56] Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;5259:680-85.
- [57] Caseiro A, Vitorino R, Barros AS, Ferreira R, Calheiros-Lobo MJ, carvalho D, Duarte JA, Amado F. Salivary peptidome in type 1 diabetes mellitus. *Biomedical Chromatography* 2012;26:571-82.
- [58] Chen X, Li Y. Role of matrix metalloproteinases in skeletal muscle. *Cell Adhesion & Migration* 2009;3(4):337-41.
- [59] Rullman E, Norrbom J, Strömberg A, Wågsäter D, Rundqvist H, Haas T, Gustafsson. Endurance exercise activates matrix metalloproteinases in human skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology* 2009;106:804-12.
- [60] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 2013;63(1):11-30.
- [61] Chalasani P, Downey L, Stopeck AT. Caring for the Breast Cancer Survivor: A Guide for Primary Care Physicians. *The American Journal of Medicine* 2010;123(6):489-95.
- [62] Cardoso F, Loibl S, Paganì O, Graziottin A, Panizza P, Martincich L, Gentilini O, Peccatori F, Fourquet A, Delaloge S, Marotti L, Penault-Llorca F, Kotti-Kitromilidou AM, Rodger A, Harbeck. The European Society of Breast Cancer Specialists recommendations for the management of young women with breast cancer *European Journal of Cancer* 2012; 48:3355-77.
- [63] Amorim LMF, Rossini A, Mendonça GAS, Lotsch PF, Simão TA, Gallo CVM, Pinto LFR. *CYP1A1, GSTM1, and GSTT1 Polymorphisms and Breast Cancer risk in Brazilian Women*. *Cancer Letters* 2002;181:179-86.
- [64] Lagerlund M, Sontrop JM, Zackrisson S. Do reproductive and hormonal risk factors for breast cancer associate with attendance at mammography screening? *Cancer Causes Control* 2013;24:1687-94.
- [65] Thompson HJ, 2011. Mammary cancer in rats. In: Teicher BA, 2011. Tumor models in cancer research. *Cancer Drug Discovery and Development*. Springer (ed), 2^a edição, Boston, USA. Pp245-53.
- [66] Lu J, Jiang C, Mitrenga T, Cutter G, Thompson HJ. Pathogenic characterization of 1-methyl-1-nitrosourea-induced mammary carcinomas in the rat. *Carcinogenesis* 1998;19(1):223-27.

- [67] Patra SK, Arora S. Integrative role of neuropeptides and cytokines in cancer anorexia-cachexia syndrome. *Clinica Chimica Acta: International Journal of Clinical Chemistry* 2012;413:1025-34.
- [68] Blum D, Omlin A, Baracos VE, Solheim TS, Tan BHL, Stone P, Kaasa S, Fearon K, Strasser F. Cancer cachexia: a systematic literature review of items and domains associated with involuntary weight loss in cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 2011;80(1):114-44.
- [69] Gundersen K. Excitation-transcription coupling in skeletal muscle: the molecular pathways of exercise. *Biological Reviews* 2011;86(3):564-600.
- [70] Lenk K, Schur R, Linke A, Erbs S, Matsumoto Y, Adams V, Schuler G. Impact of exercise training on myostatin expression in the myocardium and skeletal muscle in a chronic heart failure model. *European Journal of Heart Failure* 2009;11:342-48.
- [71] Matsakas A, Friedel A, Hertrampf T, Diel P. Short-term endurance training results in a muscle-specific decrease of myostatin mRNA content in the rat. *Acta Physiologica Scandinavica* 2005;183(3):299-307.
- [72] Hittel DS, Axelson M, Sarna N, Shearer J, Huffman KM, Kraus WE. Myostatin decreases with aerobic exercise and associates with insulin resistance. *Medicine and Science in Sports and Exercise* 2010;42(11):2023-29.
- [73] Walker KS, Kambadur R, Sharma M, Smith HK. Resistance training alters plasma myostatin but not IGF-1 in healthy men. *Medicine and Science in Sports and Exercise* 2004;36(5):787-93.
- [74] Gaudineau b, Gougère M, Guaddachi F, lemoine F, De la Grange P, Jauliac S. Lipocalin 2, the TNF-like receptor TWEAK and its ligand TWEAK act downstream of NFAT1 to regulate breast cancer cell invasion. *Journal of Cell Science* 2012;125(19):4475-86.
- [75] Dogra C, Changotra H, Wedhas N, Qin X, Wergedal JE, Kumar A. TNF-related weak inducer of apoptosis (TWEAK) is a potent skeletal muscle-wasting cytokine. *FASEB Journal* 2007;21:1857-69.
- [76] Srivastava DS, Dhaulakhandi DB. Role of NF- κ B in loss of skeletal muscle mass in cancer cachexia and its therapeutic targets. *American Journals of Cancer Biology* 2013;1(1):8-23.
- [77] Zhou W, Jiang ZW, Tian J, Jiang J, Li N, Li JS. Role of NF- κ B and cytokine in experimental cancer cachexia. *World Journal of Gastroenterology* 2003;9(7):1567-70

- [78] Ji LL, Gomez-Cabrera MC, Steinhafel N, Vina J. Acute exercise activates nuclear factor (NF)-kB signaling pathway in rat skeletal muscle. *The FASEB Journal* 2004;18:1499-1506.
- [79] Kramer HF, Goodyear LJ. Exercise, MAPK, and NF-kB signaling in skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology* 2007;103:388-95.
- [80] Rhoads MG, Kandarian SC, Pacelli F, Doglietto GB, Bossola M. Expression of NF-kappaB and IkappaB proteins in skeletal muscle of gastric cancer patients. *European Journal of Cancer* 2010;46:191-7.
- [81] Bejma J, Ji LL. Aging and acute exercise enhance free radical generation in rat skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology* 1999;87:465-70.
- [82] Wang J, Liu Y, Wei MJ, Mi XY, Wang EH. Clinical correlations and prognostic relevance of Fn14 expression in breast carcinoma. *Histology and Histopathology* 2013;28(7):859-64.