



**Paulo Jorge
de Oliveira Laranjeira**

**Plasticidade mitocondrial no catabolismo muscular
associado ao carcinoma urotelial: impacto do
exercício físico**



**Paulo Jorge
de Oliveira Laranjeira**

**Plasticidade mitocondrial no catabolismo muscular
associado ao carcinoma urotelial: impacto do
exercício físico**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, Ramo Bioquímica Clínica, realizado sob a orientação científica 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 participado pelo Fundo Comunitário Europeu (FEDER) aos projetos Pest-C/QUI/UI0062/2013, EXPL/DTP-DES/1010/2013 e FCOMP-01-0124-FEDER-041115.



QOPNA
UI Química Orgânica, Produtos Naturais e Agro-alimentares

Dedico este trabalho aos meus pais

O júri

Presidente

Professora Doutora Rita Maria Pinho Ferreira
Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Vogais

Doutora Ana Isabel Martins Novais Padrão (orientadora)
Investigadora de pós-doutoramento do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

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

Agradecimentos

Em vias de concluir mais uma etapa não posso deixar de agradecer aos que de alguma forma marcaram o meu percurso e me fizeram crescer.

Gostaria de expressar a maior gratidão à Doutora Ana Isabel Padrão, minha orientadora durante este trabalho. Muito obrigado pelo apoio constante, dedicação ao trabalho, entusiasmo e simpatia, assim como o profissionalismo exemplar demonstrado, com o qual aprendi muito.

À Professora Doutora Rita Ferreira, obrigado pelas críticas voluntárias ao trabalho.

Ao Professor Doutor José Alberto Duarte, muito obrigado pela receção no Laboratório de Bioquímica da FADEUP e por todo o apoio durante a minha estadia. Obrigado à Dona Celeste por toda a ajuda prestada na histologia animal, e acima de tudo pela amizade e companhia constantes desde o primeiro dia. De igual forma, devo também estender os meus agradecimentos ao Júlio, Daniela, Eduardo, Cristine, Daniel, Nilton, Fernando, Toni e Camila por me receberem sempre com boa disposição e tornarem a minha estadia na FADEUP em algo memorável!

Ao Dani, obrigado pela amizade e apoio incansável, especialmente durante o último ano. Obrigado por todos os nossos passeios, risadas, desabafos e também pelas sessões fotográficas “à moda antiga”, que muito me ajudaram a descomprimir. Ao André Eduardo e ao Filipe, obrigado pela vossa amizade e companhia em inúmeras tardes no “café do costume”, e também por todas as saídas improvisadas em Espinho.

Aos amigos de longa data, Manuel, Cohen, Diogo e Rodrigues, e também a todos os companheiros de Aveiro, em especial à Andreia, Stéphanie, Gina, António, Selesa, Cátia, Diana e Daniel Pereira. Obrigado por me acompanharem ao longo dos anos, pela partilha de experiências e por compreenderem a minha ausência nos últimos tempos.

Aos meus pais, Esmeralda e Emílio, e ao meu irmão André – sem vocês simplesmente não conseguiria chegar até aqui! Obrigado pelo apoio incessante, principalmente nas fases mais difíceis.

A todos, um sincero e sentido *obrigado!*

Palavras-chave

caquexia, cancro, músculo esquelético, mitocôndria, exercício

Resumo

A caquexia associada ao cancro é uma síndrome multifatorial que representa um grande desafio em oncologia clínica. Esta síndrome é caracterizada por uma perda de peso significativa, principalmente devido ao catabolismo acentuado na massa muscular esquelética e, por isso, tem um impacto negativo na qualidade de vida, na tolerância à terapêutica e no tempo de sobrevivência dos pacientes. A disfunção mitocondrial tem sido sugerida como um evento precoce associado à atrofia muscular induzida pelo cancro. Mais especificamente, o comprometimento do *turnover* mitocondrial (biogénese, dinâmica e mitofagia), a diminuição da síntese de ATP, aumento do stresse oxidativo e um aumento da suscetibilidade à apoptose parecem mediar a disfunção contrátil e o catabolismo muscular subjacentes à caquexia associada ao cancro. O exercício físico tem vindo a ser estudado como uma abordagem terapêutica, devido aos seus efeitos potencialmente benéficos advindos da adaptação mitocondrial e muscular na caquexia associada ao cancro.

No sentido de averiguar o efeito do cancro e do exercício físico terapêutico na adaptação muscular esquelética, foi usado um modelo animal de carcinoma urotelial induzido por exposição a BBN e submetido a 13 semanas de corrida em tapete rolante após o diagnóstico. Constatou-se um decréscimo do peso corporal nos animais expostos a BBN, indicativo de caquexia. Paralelamente, ocorreu uma diminuição da área da secção transversal do músculo *gastrocnemius* e aumento de fibrose intersticial, sugestivos de um perfil inflamatório generalizado e catabolismo muscular, atenuados com a prática de exercício físico. Para além disso, o carcinoma urotelial promoveu a disfunção mitocondrial ao nível do sistema de fosforilação oxidativa, diminuindo a expressão de subunidades dos complexos I e II da OXPHOS e a capacidade de síntese de ATP. Verificou-se de igual modo um comprometimento da biogénese mitocondrial, traduzida por uma redução nos níveis de PGC-1 α e Tfam, sem impacto na (auto)mitofagia. O exercício físico realizado após o diagnóstico promoveu o restabelecimento da síntese de ATP e da expressão de subunidades dos complexos I e II da OXPHOS, para além de aumentar os marcadores da biogénese mitocondrial (incluindo a Sirt3), assim como da mitofagia (com envolvimento da Bnip3).

Os resultados obtidos indicam que a prática de exercício físico após o diagnóstico promove uma remodelação benéfica ao nível do músculo *gastrocnemius* por regular a plasticidade mitocondrial nos animais com caquexia associada ao cancro. Deste modo, evidências obtidas no presente estudo suportam a recomendação da prática de exercício físico a pacientes oncológicos.

Keywords

cachexia, cancer, skeletal muscle, mitochondria, exercise

Abstract

Cancer cachexia is a multifactorial syndrome that presents a great challenge in clinical oncology. This syndrome is characterized by significant weight loss, mainly due to severe skeletal muscle wasting, which has a negative impact on quality of life, tolerance to treatment and life expectancy of patients. Mitochondrial dysfunction has been suggested as an early event associated with cancer induced muscle atrophy. Specifically, impaired mitochondrial turnover (biogenesis, dynamics and mitophagy), reduced ATP synthesis, higher levels of oxidative stress and higher susceptibility to apoptosis seem to compromise muscle contraction and promote catabolism associated with cancer cachexia. Recently, exercise training has been studied as a therapeutic approach due to its potentially beneficial effects in mitochondrial and muscle adaptation in cancer cachexia.

In order to determine the impact of cancer and exercise training in skeletal muscle adaptation, an animal model of bladder cancer induced by exposure to BBN was submitted to 13 weeks of treadmill running after the establishment of the disease. Bladder cancer alone promoted a decrease in total body weight, suggesting the presence of cachexia. At the same time, a reduction in the cross sectional area of *gastrocnemius* muscle and an increase in interstitial fibrosis were noticed, suggesting an inflammatory profile and catabolism, which were attenuated by exercise training. Moreover, bladder cancer compromised oxidative phosphorylation in muscle mitochondria, reducing the levels of complex I and II OXPHOS subunits and causing impaired ATP synthesis. Mitochondrial biogenesis was reduced, evidenced by lower levels of PGC-1 α and Tfam, without impact in (auto)mitophagy. Exercise training promoted the reestablishment of ATP synthesis and the expression of complex I and II OXPHOS subunits, as well as an increase in mitochondrial biogenesis markers (including Sirt3) and mitophagy (through Bnip3).

Present data highlight the beneficial effects of endurance exercise on cancer cachexia-related muscle remodeling through the regulation of mitochondrial plasticity. As such, our data support the recommendation of physical activity to cancer patients for the management of cachexia.

Índice

<i>i.</i>	<i>Lista de figuras</i>	<i>III</i>
<i>ii.</i>	<i>Lista de tabelas</i>	<i>V</i>
<i>iii.</i>	<i>Abreviaturas</i>	<i>VII</i>
I.	Introdução	1
II.	Revisão da literatura	5
1.	Caquexia associada ao cancro	5
1.1	Alterações no músculo esquelético subjacentes à caquexia associada ao cancro	6
1.1.1	Mediadores envolvidos no controlo da massa muscular	8
1.1.2	Vias de sinalização reguladoras da massa muscular esquelética	9
2.	Plasticidade mitocondrial do músculo esquelético na caquexia associada ao cancro	11
2.1	Contribuição da biogénese e mitofagia para a caquexia associada ao cancro	15
3.	O exercício físico como estratégia terapêutica para a caquexia associada ao cancro	17
III.	Objetivos	23
IV.	Materiais e métodos	25
1.	Reagentes	25
2.	Procedimento experimental	25
2.1	Protocolo animal	26
2.2	Indução de cancro urotelial e protocolo de exercício físico	27
3.	Análise de parâmetros bioquímicos no soro	27
4.	Análise histológica do músculo <i>gastrocnemius</i>	28
4.1	Preparação da amostra.....	28
4.2	Coloração por Hematoxilina-Eosina.....	29
4.3	Coloração por <i>Picrosirius Red</i>	30
5.	Isolamento de mitocôndrias do músculo esquelético	30
6.	Determinação da concentração de proteína total.....	31
7.	Determinação da atividade do complexo V da cadeia respiratória mitocondrial.....	31
8.	Análise da expressão proteica por Western blotting	32
9.	Análise estatística	33
V.	Resultados	35
1.	Caracterização da resposta animal à exposição ao BBN e/ou à prática de ERTMLD	35
2.	Caracterização morfológica do músculo <i>gastrocnemius</i> em resposta à exposição ao BBN e/ou à prática de ERTMLD	37

3. Remodelação metabólica do músculo <i>gastrocnemius</i> em resposta à exposição ao BBN e/ou à prática de ERTMLD	39
4. Impacto da exposição ao BBN e/ou à prática de ERTMLD na biogénese mitocondrial	41
5. Impacto da exposição ao BBN e/ou à prática de ERTMLD na (auto)mitofagia	42
VI. Discussão	45
VII. Conclusão	53
VIII. Referências bibliográficas	55

i. Lista de figuras

Figura 1: Visão geral dos fenómenos celulares que conduzem à caquexia.....	3
Figura 2: Principais vias de regulação da massa muscular esquelética.....	10
Figura 3: Visão geral das alterações moleculares subjacentes à disfunção mitocondrial do músculo esquelético durante a caquexia associada ao cancro.	13
Figura 4: Mecanismos moleculares subjacentes à disfunção mitocondrial do músculo esquelético que podem estar associados à regulação da perda de massa muscular subjacente à caquexia.	14
Figura 5: Efeitos do exercício físico nas vias de sinalização responsáveis pela caquexia associada ao cancro.	19
Figura 6: Visão geral do procedimento experimental efetuado no presente estudo.	26
Figura 7: Protocolo de processamento de amostras em parafina para microscopia ótica.....	28
Figura 8: Protocolo para as colorações de Hematoxilina-Eosina e <i>Picrosirius Red</i> efetuadas neste estudo.	29
Figura 9: Efeito da exposição ao BBN e/ou à prática de exercício físico na área da secção transversal do músculo <i>gastrocnemius</i>	37
Figura 10: Efeito da exposição ao BBN e/ou à prática de exercício físico nos níveis de fibrose intersticial do músculo <i>gastrocnemius</i>	38
Figura 11: Efeito da exposição ao BBN e/ou à prática de ERTMLD na expressão mitocondrial da ATPB avaliada por Western blotting, atividade da ATP sintase na mitocôndria avaliada por espetofotometria, expressão da ATPB no músculo total e expressão da GAPDH no músculo total avaliadas por Western blotting e do rácio ATPB/GAPDH.	40
Figura 12: Efeito da exposição ao BBN e/ou à prática de ERTMLD na expressão das subunidades OXPHOS nas mitocôndrias do músculo <i>gastrocnemius</i> de todos os animais dos grupos experimentais.	41
Figura 13: Efeito da exposição ao BBN e/ou à prática de ERTMLD nos níveis de PGC-1 α do músculo total, Tfam mitocondrial e Sirt3 mitocondrial.	42
Figura 14: Efeito da exposição ao BBN e/ou à prática de ERTMLD nos níveis de LC3BI e LC3BII musculares, rácio LC3BII/LC3BI muscular, níveis de LC3BI e LC3BII mitocondriais, rácio LC3BII/LC3BI mitocondrial e Bnip3 mitocondrial.....	43
Figura 15: Visão geral dos resultados obtidos no estudo presente, promovidos pela exposição animal ao BBN e/ou à prática de exercício físico terapêutico.	51

ii. Lista de tabelas

Tabela 1: Caracterização dos animais dos quatro grupos experimentais em termos de peso corporal, da massa de músculo <i>gastrocnemius</i> e do rácio massa de <i>gastrocnemius</i> /peso corporal.	35
Tabela 2: Efeitos da exposição ao BBN e/ou ao ERTMLD nos parâmetros bioquímicos do soro dos quatro grupos experimentais.	36

iii. Abreviaturas

AIF	Fator indutor de apoptose
Akt	Serina/treonina cinase B
ALAT	Alanina transaminase
ALP	Fosfatase alcalina
ASAT	Aspartato aminotransaminase
ATP	Adenosina trifosfato
ATPB	ATP sintase subunidade β
Atg	Gene relacionado com a autofagia
BBN	<i>N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)-nitrosamine</i>
Bnip3	<i>Bcl-2/adenovirus E1B interacting protein 3</i>
BSA	Albumina sérica bovina
CASCO	<i>Cachexia Score</i>
CK	Creatina cinase
COX	Citocromo c oxidase
CSA	Área da secção transversal
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DPX	Meio de montagem contendo distireno, fosfato de tricresilo e xileno
Drp1	Proteína relacionada com a dinamina 1
EETMCD	Exercício de elevada tensão mecânica e curta duração
ERTMLD	Exercício de reduzida tensão mecânica e longa duração
Fis1	Proteína de fissão mitocondrial 1
FoxO	<i>Forkhead box O transcription factors</i>
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
Hsp	Proteína de choque térmico
i-AAA	Protease do espaço intermembranar mitocondrial contendo ATPase associada a diversas atividades celulares
IFN-γ	Interferão- γ
IGF-1	<i>Insulin-like growth factor-1</i>
IL	Interleucina
IL6R	Recetor de interleucina-6
IMF	Mitocôndrias intermiofibrilares

LC3B	<i>Microtubule-associated protein 1 light chain 3 isoform b</i>
Lon	Protease dependente de ATP (nome derivado do gene lon da <i>E. coli</i>)
LPL	Lipoproteína lipase
m-AAA	Protease da matriz mitocondrial contendo ATPase associada a diversas atividades celulares
Map1lc3a	<i>Microtubule-associated protein 1 light chain 3 alpha</i>
Mfn	Mitofusina
MHC	Cadeia de miosina pesada
mRNA	RNA mensageiro
mtDNA	Ácido desoxiribonucleico mitocondrial
mtHsp60	Proteína de choque térmico mitocondrial de 60 kDa
mTOR	Alvo da rapamicina nos mamíferos
mtTFA	Fator de transcrição mitocondrial A – ver “Tfam”
MuRF-1	<i>Muscle ring finger-1</i>
NF-κB	Fator nuclear-kappa B
NRF1	Fator de respiração nuclear 1
NRF2	Fator de respiração nuclear 2
Opa1	<i>Optic atrophy 1</i>
OXPHOS	Sistema de fosforilação oxidativa
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Proteína C-reativa
PE	Fosfatidiletanolamina
PGC-1α	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor-γ coactivator-1α</i>
PIF	Fator de indução de proteólise
PINK1	<i>PTEN-induced putative kinase 1</i>
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SIDA	Síndrome da imunodeficiência adquirida
Sirt3	Sirtuína mitocondrial 3
SS	Mitocôndrias subsarcolemais
TBS-T	Tampão Tris-salino-Tween
Tfam	Fator de transcrição mitocondrial A
TG	Triglicerídeos
TNF-α	Fator de necrose tumoral-α
TWEAK	Indutor fraco da apoptose relacionado com o TNF

I. Introdução

A caquexia é uma síndrome multifatorial que constitui um dos aspectos mais debilitantes e potencialmente fatais frequentemente associada a estadios terminais de doença, afetando cerca de nove milhões de pacientes em todo o mundo (1). Caracteriza-se por perda de peso excessiva e involuntária, anorexia e baixa resposta hormonal (ex.: resistência à insulina) (2). É também responsável por uma resposta inflamatória crónica que envolve citocinas pro-inflamatórias e fatores pro-caquéticos, que desregulam as vias de síntese/degradação proteica musculares, conduzindo a um estado altamente catabólico (3,4). Esta síndrome está normalmente associada a diversas doenças crónicas e malignas, incluindo cancro, doença pulmonar obstrutiva crónica, doenças cardiovasculares, diabetes *mellitus*, artrite reumatóide e síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) (5,6). A caquexia associada ao cancro contribui para um mau prognóstico através da perda progressiva de energia corporal e de reservas proteicas. Caracteriza-se por um estado altamente catabólico do músculo esquelético, que se encontra atrofiado, devido a desregulações no balanço síntese/degradação proteica, o que origina perda de peso excessiva no paciente (7). A natureza complexa e multifatorial desta síndrome dificulta a aplicação de um tratamento eficaz, resultando em estratégias que podem variar com a severidade da doença (8).

A resposta do músculo esquelético a estímulos externos tais como inflamação, hormonas e contração é dependente de vias sinalizadoras que envolvem vários organelos celulares. O músculo esquelético depende do metabolismo oxidativo para assegurar o seu funcionamento normal. Como todas as vias de sinalização subjacentes ao controlo da massa muscular são dependentes de ATP, qualquer alteração na homeostasia mitocondrial tem impacto na função muscular (2,9,10). Para além da produção de ATP, a mitocôndria é crucial na regulação da apoptose, mitofagia, biogénese mitocondrial e *turnover* proteico. A disfunção mitocondrial é uma característica proeminente em várias condições de atrofia muscular, razão pela qual o seu envolvimento no controlo da massa muscular esquelética tem recebido grande atenção pela comunidade científica nos últimos anos (11,12).

As mitocôndrias são negativamente afetadas pela caquexia associada ao cancro, levando à incapacidade de se adaptarem a elevados níveis de stresse oxidativo e consequentemente contribuem para a perda de massa e função muscular (ver Figura 1). A inflamação sistémica generalizada e inatividade física inerentes em pacientes com caquexia

associada ao cancro contribuem para a disfunção mitocondrial. Os níveis sistémicos de interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral- α (TNF- α), indutor fraco da apoptose relacionado com o TNF (TWEAK) e miostatina aumentam durante a progressão da caquexia, resultando na ativação de vias sinalizadoras para a degradação proteica, moduladas por fator nuclear-kappa B (NF- κ B) e *forkhead box O transcription factors* (FoxO), assim como na geração de espécies reativas de oxigénio (ROS) (8). Durante a progressão da caquexia associada ao cancro ocorre diminuição das vias de síntese proteica como Akt-mTOR e/ou diminuição da expressão de fatores relacionados com a biogénese mitocondrial, tais como *peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α* (PGC-1 α). Existe portanto um desequilíbrio entre a síntese/degradação proteica no músculo esquelético (13,14).

A disfunção mitocondrial e consequente redução do número de mitocôndrias e expressão de factores envolvidos na biogénese mitocondrial têm sido considerados como potentes indutores da perda de massa muscular (15). As vias de sinalização celulares responsáveis pela regulação do *turnover* mitocondrial encontram-se desreguladas durante a caquexia associada ao cancro, resultando numa diminuição da remoção de organelos danificados na célula e, conseqüentemente, sua acumulação na fibra muscular. Quando o sistema de controlo de qualidade mitocondrial (sistema antioxidante, chaperonas, proteases e *turnover* mitocondrial) está comprometido e não é restabelecido, a apoptose é ativada e leva à perda de massa muscular, contribuindo para o catabolismo muscular (16). No entanto, apesar de décadas de investigação, os mecanismos moleculares pela qual a perda de massa muscular se desenvolve no cancro não permanecem totalmente esclarecidos. Neste sentido, a compreensão dos mecanismos moleculares que regulam a plasticidade mitocondrial durante a caquexia associada ao cancro tornam-se fulcrais para o desenvolvimento de terapias eficazes. Recentemente, o exercício físico tem vindo a ser estudado como possível abordagem terapêutica, devido aos seus efeitos potencialmente benéficos advindos da adaptação mitocondrial e muscular que provoca (17–20).

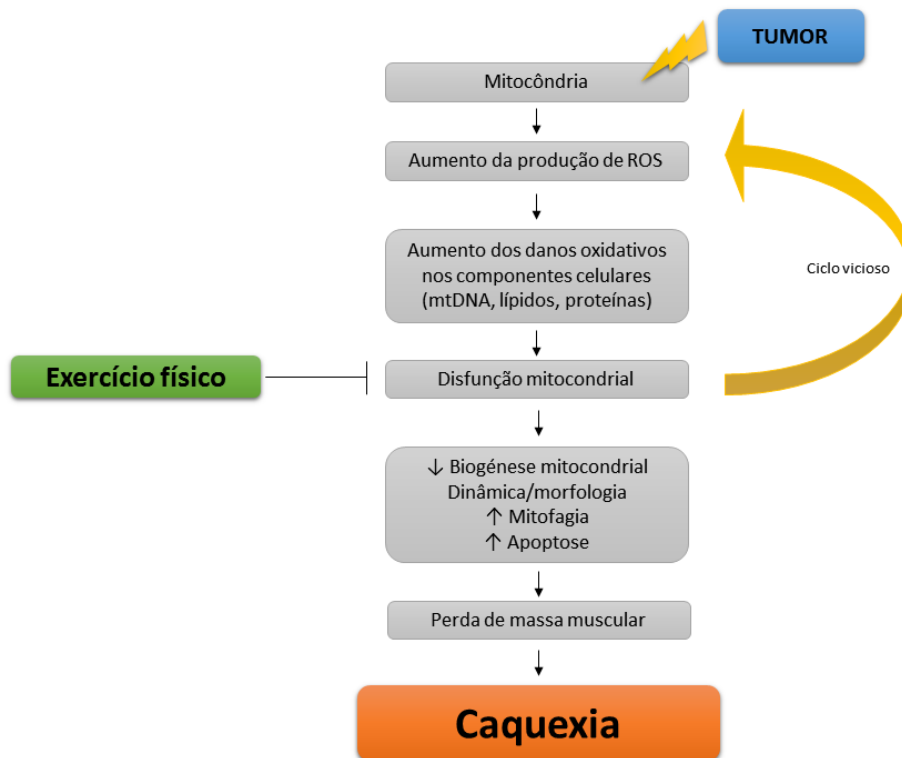


Figura 1: Visão geral dos fenômenos celulares que conduzem à caquexia. O exercício físico atenua o ciclo vicioso disfunção mitocondrial-produção de ROS e induz benefícios que melhoram o estado físico do paciente oncológico (21).

O exercício físico tem sido sugerido como uma estratégia terapêutica capaz de contrariar as alterações relacionadas com a disfunção mitocondrial e a perda de massa muscular esquelética associada à caquexia. A prática de exercício físico está associada ao restabelecimento do *turnover* mitocondrial através da regulação de mecanismos de mitofagia e biogênese mitocondrial, promovendo uma *pool* de mitocôndrias funcionais e, conseqüentemente, preservação da massa muscular (21,22). A PGC-1 α , que regula processos relacionados com a biogênese mitocondrial através da indução da transcrição de genes como fator de transcrição mitocondrial A (Tfam) e fatores de respiração nuclear 1 e 2 (NRF-1 e NRF-2) contribuem para esta manutenção muscular (8). Existem evidências que apontam um decréscimo na expressão de PGC-1 α em quadros clínicos de caquexia (15,23), no entanto a prática de exercício físico parece ter um papel protetor contra a atrofia muscular através da modulação de PGC-1 α (24). O exercício também tem sido apontado como modulador da dinâmica mitocondrial, contribuindo para a adaptação das mitocôndrias ao ambiente em que se encontram, favorecendo os processos de fissão mitocondrial e atenuando os processos de fusão (25). No entanto, a magnitude destas adaptações induzidas pela prática de exercício

físico na caquexia associada ao cancro apenas começam a ser estudadas (20,22,26–29). Baseado nestas observações, é necessária uma melhor compreensão das vias moleculares moduladas pelo cancro e/ou atividade física de forma a justificar a recomendação da prática de exercício físico a doentes oncológicos.

II. Revisão da literatura

1. Caquexia associada ao cancro

A caquexia é um termo que deriva do grego “*kakos*” e “*hexis*”, significando “má condição” (12). É uma síndrome complexa e multifatorial, caracterizada pela perda de peso involuntária e excessiva, igual ou superior a 5% num período inferior ou igual a 12 meses (30). Esta perda de massa muscular advém da depleção de tecido muscular esquelético e das reservas de tecido adiposo, manifestando-se por anorexia, perda e atrofia muscular, astenia, anemia, resistência à insulina e ainda por alterações metabólicas e comprometimento da função imunológica (31,32). É caracterizada também pela incapacidade de recuperar o peso perdido através de apoio nutricional suplementar (33). Esta condição patológica apresenta uma elevada incidência nos doentes com cancro em estádios avançados, afetando cerca de 50% dos pacientes oncológicos (2,34), e é responsável por aproximadamente 30% das mortes associadas (35). A incidência da caquexia está relacionada com o tipo de cancro, sendo muito elevada no cancro da cabeça-pescoço (57%), pancreático (54%), pulmão (36%) e colon-retal (28%) (35,36), manifestando-se também no cancro da mama (37) e no carcinoma urotelial (38).

O grau de caquexia é inversamente correlacionado com o tempo de sobrevida dos doentes e está associado à intolerância a terapias e baixa qualidade de vida, reduzindo drasticamente a autonomia dos doentes (39). A falta de um sistema de classificação implementado na clínica para o estadiamento da caquexia constitui um obstáculo para o diagnóstico e tratamento eficazes desta síndrome. Neste sentido, tendo em consideração a complexidade da caquexia associada ao cancro, foi proposto um critério de classificação que prevê 4 estádios – ligeira, moderada, severa e terminal – que permitem avaliar o grau de caquexia e prever a abordagem terapêutica mais adequada (30). Este sistema de classificação tem em consideração parâmetros tais como a perda de peso corporal e a composição da massa corporal, distúrbios metabólicos/inflamatórios, imunossupressão, *performance* física, anorexia e qualidade de vida. A diferenciação do estadio de caquexia é feita tendo em consideração as classificações obtidas em questionários pré-estabelecidos que avaliam os parâmetros referidos. Os dados são incorporados numa escala final denominada *Cachexia Score* (CASCO), sendo que o grau de severidade é tanto maior quanto mais elevada for a

classificação, que pode variar entre 0 a 100. Sucintamente, numa fase inicial da doença os pacientes apresentam uma perda de peso pouco acentuada (inferior a 5%), no entanto com a progressão da mesma para estadios mais avançados ocorre um aumento do catabolismo muscular esquelético, depleção de reservas energéticas (tecido adiposo) e imunossupressão, podendo resultar na morte do doente, que ocorre num estadio terminal (39).

A patogénese relacionada com a perda de massa muscular que ocorre na caquexia associada ao cancro ainda permanece pouco clara. No entanto, várias evidências sugerem um comprometimento das vias de sinalização que regulam a síntese e a degradação de proteínas no músculo esquelético, acompanhado de perda da capacidade oxidativa do músculo (9,12,40). Atualmente, não existe um tratamento efetivo para a caquexia associada ao cancro, sendo necessário mais investigação nesta área no sentido de desvendar os mecanismos subjacentes e desenvolver estratégias terapêuticas (4).

1.1 Alterações no músculo esquelético subjacentes à caquexia associada ao cancro

O músculo esquelético contribui em cerca de 40% para a massa corporal e é conhecido pela sua atividade metabólica elevada (41). É um órgão altamente dinâmico que pode alterar as suas características fenotípicas, proporcionando uma melhor adaptação funcional em resposta a estímulos externos (42). O controlo da sua massa tem um papel fundamental na manutenção da condição física do indivíduo, incluindo regulação do metabolismo e controlo do sistema imunitário, além de assegurar funções básicas como a geração de força, locomoção e capacidade de respiração (14).

O músculo esquelético humano é um órgão extremamente heterogéneo, composto por uma grande variedade de tipos de fibras que diferem no que diz respeito ao seu tamanho, tipo de metabolismo que apresentam (glicolítico ou oxidativo) e função contrátil (14). Apesar de existirem múltiplos níveis de distinção entre as fibras musculares, o sistema de classificação mais ubíquo recorre ao tipo de isoforma da cadeia de miosina pesada que está presente (MHC) (43). Desta forma, as fibras musculares podem ser divididas em dois grandes grupos: Tipo I, habitualmente designadas por fibras de contração lenta, e Tipo II, frequentemente chamadas de fibras de contração rápida. Estas últimas podem ser ainda

divididas em 3 sub-grupos, Tipo IIa, Tipo IId/x e Tipo IIb. As fibras Tipo I possuem um maior número de mitocôndrias e usam preferencialmente a fosforilação oxidativa para obtenção de energia, sendo estas fibras mais resistentes à fadiga e ao esforço prolongado (14). Em contraste, as fibras Tipo II são menos resistentes à fadiga e são responsáveis pela execução de movimentos de curta duração. Dentro deste grupo as fibras Tipo IIb são predominantemente glicolíticas e as Tipo IIa são preferencialmente oxidativas, embora o tipo de metabolismo presente seja flexível consoante as condições a que o músculo se encontra submetido numa dada altura. A composição do músculo em relação aos diferentes tipos de fibras depende da sua função (43). Músculos como, por exemplo, o músculo *soleus*, possuem maior proporção de fibras de contração lenta (Tipo I), oxidativas e resistentes à fadiga. Este tipo de músculo é capaz de gerar todo o ATP que necessita através de processos oxidativos, daí o seu elevado número de mitocôndrias. A sua taxa de consumo de ATP não é tão elevada quando comparada com músculos de contração rápida, o que lhe permite manter uma atividade contrátil durante mais tempo sem sinais de fadiga. Por outro lado, músculos como, por exemplo, os bíceps, possuem maior quantidade de fibras de contração rápida (Tipo IIb), dependentes de processos glicolíticos para gerar ATP de forma rápida, o que acaba por limitar a duração da sua atividade contrátil (44,45). Por sua vez, o músculo *gastrocnemius* apresenta heterogeneidade quanto aos tipos de fibra que possui, sendo constituído em mais de 50% por fibras Tipo IId/x e 15-21% em fibras Tipo I (46).

Em modelos animais de caquexia associada ao cancro verifica-se perda de massa muscular tanto ao nível das fibras oxidativas como também ao nível das fibras glicolíticas (47), embora tenha sido sugerido uma maior degeneração das fibras Tipo II em quadros de caquexia (48). Uma diminuição da área da secção transversal das fibras tem sido observada tanto nas fibras musculares oxidativas como nas glicolíticas em condições de caquexia associada ao cancro (47,49). A avaliação morfológica do músculo esquelético revelou várias alterações estruturais tais como diminuição do tamanho das fibras musculares e perda de MHC (47,49). Estas alterações foram acompanhadas por profundas alterações no citoplasma tais como diminuição do número e da integridade das mitocôndrias, assim como da expressão de proteínas associadas à fosforilação oxidativa (41), resultando numa diminuição da capacidade oxidativa do músculo esquelético (10). Várias evidências sugerem um comprometimento da capacidade de regeneração muscular em condições de atrofia muscular (10,50).

Em condições de homeostasia, a massa muscular é mantida através do equilíbrio entre as vias de síntese e de degradação de proteínas (42,51). Alterações neste equilíbrio podem resultar na hipertrofia do músculo (aumento da síntese e diminuição da degradação) ou perda da massa muscular (diminuição da síntese e aumento da degradação). A perda da massa muscular esquelética é um fator importante na progressão da caquexia. Em resposta a mediadores secretados pelo tumor e/ou pelo hospedeiro, ocorre um desequilíbrio entre as vias de síntese/degradação, com conseqüente diminuição do conteúdo proteico muscular, do diâmetro das fibras, bem como da capacidade de produção de energia, culminando na perda de massa muscular (13,42,52).

1.1.1 Mediadores envolvidos no controlo da massa muscular

Os mecanismos responsáveis pela perda de massa muscular esquelética na caquexia associada ao cancro são multifatoriais. Evidências sugerem que a regulação da massa muscular esquelética é dependente de uma rede complexa de vias de sinalização que se interligam e trabalham em conjunto (8,13). Hormonas, citocinas pro-inflamatórias e fatores pro-caquéticos, produzidos pelo hospedeiro em resposta ao crescimento do tumor ou secretados pelas próprias células tumorais, são mediadores da perda de massa muscular, induzindo uma desregulação no balanço entre a síntese e a degradação de proteínas nas fibras musculares (9,53). No entanto, o envolvimento e regulação destas vias de sinalização na patogénese da caquexia associada ao cancro permanecem ainda pouco esclarecidos e têm sido alvo de estudos recentes (14,52,54,55).

A inflamação sistémica tem sido reconhecida como uma característica da caquexia associada ao cancro em que estão envolvidas várias citocinas circulantes e fatores pro-caquéticos que induzem uma resposta de fase aguda, anomalias na síntese e degradação proteicas, assim como disfunção no metabolismo de aminoácidos, diminuição da regeneração do tecido muscular e ativação da apoptose (2). Esta resposta inflamatória é mediada a nível molecular pelo TNF- α , IL-1, IL-6, interferão- γ (IFN- γ), fator de indução de proteólise (PIF), miostatina e TWEAK, entre outros, promovendo o desenvolvimento do fenótipo caquético no músculo esquelético (2,17,56,57). Estes fatores 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 citocinas incluindo a IL-6, desencadeando uma cascata de eventos que culminam na síntese hepática de fase aguda, maioritariamente a proteína C-reativa (PCR) (4,58). O fator TNF- α é frequentemente detetado em amostras de tumor e a sua presença tem sido associada a um mau prognóstico, baixa resposta hormonal e caquexia/astenia (4). Adicionalmente, o aumento dos níveis séricos de TNF- α e IL-6 tem sido detetado em doentes que apresentam estadios avançados de doença (58,59). A expressão de IL-6 quando induzida pelo tumor parece estar associada à perda de peso e mau prognóstico em doentes oncológicos. Ao nível das fibras musculares esta citocina interage com o seu recetor (IL6R), promovendo um aumento da proteólise muscular. O bloqueio da atividade desta citocina reverte alguns sintomas da caquexia, em particular a perda de peso (60).

Várias evidências 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 e à caquexia (2). O PIF, por exemplo, é um proteoglicano que promove um aumento do catabolismo no músculo esquelético através da via ubiquitina-proteassoma, envolvida na degradação de proteínas miofibrilares (61). Para além de induzir a proteólise, PIF tem também capacidade indutora de apoptose celular através da ativação de caspases. O fator PIF tem sido detetado na urina de pacientes com carcinoma do pâncreas, mama, ovários, pulmão, cólon e reto (62).

1.1.2 Vias de sinalização reguladoras da massa muscular esquelética

Diversas vias de sinalização intracelulares estão envolvidas na regulação das miofibrilas e na *performance* do músculo esquelético. A massa do músculo esquelético é regulada por uma série de processos: adição de mionúcleos às miofibrilas, apoptose de mionúcleos, síntese de proteínas musculares e proteólise muscular (63). O catabolismo muscular esquelético está associado ao comprometimento das diferentes vias de sinalização, resultando num aumento da degradação proteica (11,12,54). Na Figura 2 estão representadas as principais vias de sinalização envolvidas no controlo de massa muscular. A diminuição da síntese de proteínas pode resultar, pelo menos em parte, de alterações na ativação das vias

de sinalização Akt-mTOR e miostatina/activina. Por outro lado, a perda de massa muscular é multifatorial e parece resultar da ação de diversas vias proteolíticas que incluem a via ubiquitina-proteassoma, via das calpaínas e via lisossomal (14,42,52).

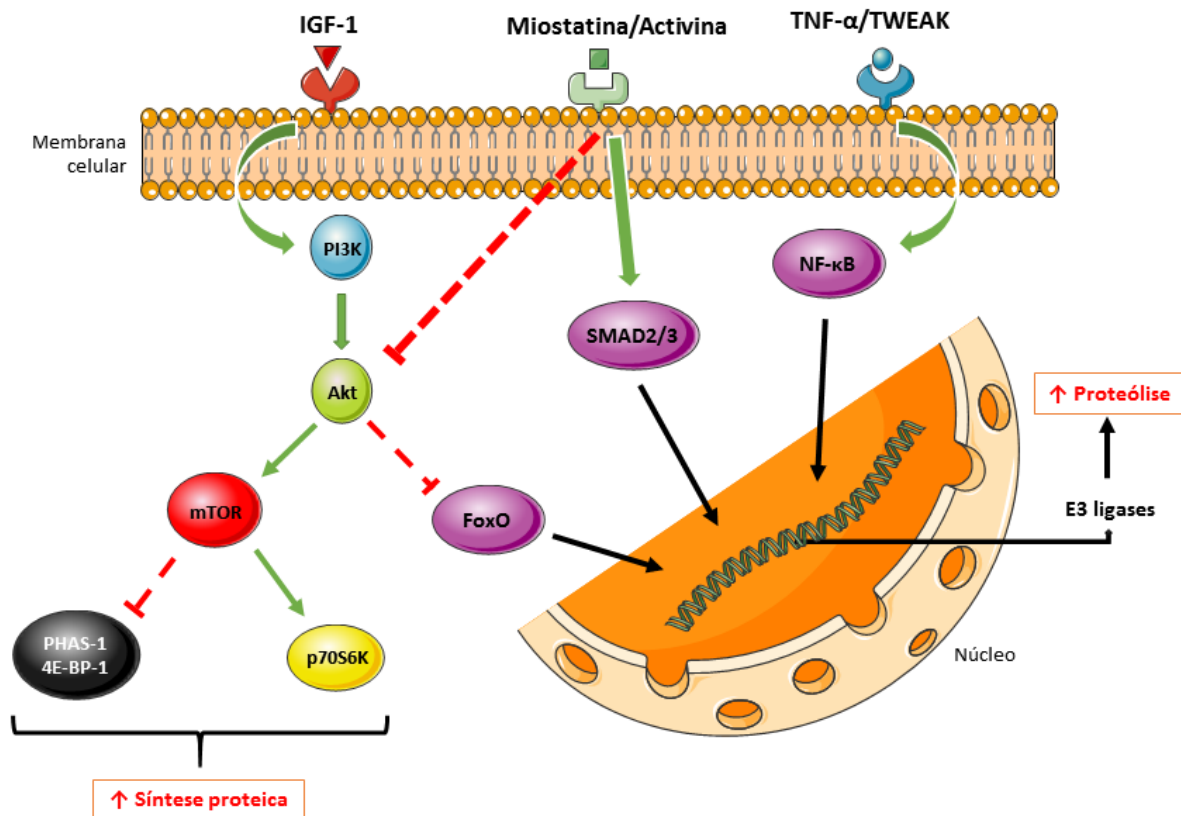


Figura 2: Principais vias de regulação da massa muscular esquelética. A IGF-1 ativa a via Akt-mTOR, responsável pela síntese de proteínas e inibição da sua degradação. TNF- α e TWEAK estimulam a translocação de NF- κ B para o núcleo, induzindo um efeito proteolítico. Por sua vez, a miostatina e a activina inibem a diferenciação e função musculares através da indução da transcrição de atrogenes (adaptado de (64)).

Figura elaborada com base no *Servier Medical Art* (<http://www.servier.com/Powerpoint-image-bank>).

Um dos estímulos mais estudados no controlo da massa muscular é desencadeado pela *insulin-like growth factor-1* (IGF-1) (54). Como se pode observar na Figura 2, a IGF-1 regula o balanço síntese-degradação da massa muscular por duas vias distintas, dependendo do estado de fosforilação da molécula de Akt: a via Akt-mTOR, que controla a síntese proteica, e a via FoxO, responsável pela degradação (14). A miostatina é um regulador negativo do desenvolvimento do músculo esquelético. A diminuição da expressão de miostatina induz crescimento e desenvolvimento muscular, no entanto o aumento da sua

expressão induz atrofia muscular (52). O fator TNF- α estimula a translocação do fator de transcrição NF- κ B para o núcleo, provocando aumento da expressão de genes responsáveis pela degradação proteica tais como atrogina-1 e *muscle ring finger-1* (MuRF-1) (9,13). Para além disso, TNF- α atua em conjunto com IL-1 no bloqueio do processo de diferenciação dos mioblastos (células precursoras de fibras musculares) através da inibição da via Akt-mTOR (65,66). No entanto, o mecanismo de ação de TNF- α ainda não se encontra completamente elucidado e a associação entre as suas concentrações e o grau de caquexia é ainda um assunto controverso (9).

2. Plasticidade mitocondrial do músculo esquelético na caquexia associada ao cancro

As mitocôndrias são organelos vitais para o bom funcionamento do músculo esquelético, englobando cerca de 4-7% do volume deste órgão (67) e constituindo uma importante fonte energética para a contração muscular (12,68). Além disso, têm um papel central em muitos outros processos celulares fundamentais, tais como a síntese de metabolitos, a regulação do sistema de controlo de qualidade proteica (chaperonas e proteases), a apoptose e o stresse oxidativo. Pelo papel que desempenha na produção de ATP, o músculo esquelético é muito dependente da funcionalidade mitocondrial (41). Por isso, não é surpreendente que qualquer alteração na homeostasia mitocondrial tenha impacto na função e organização do músculo esquelético. No sentido de satisfazer as necessidades energéticas dos tecidos, as mitocôndrias exibem uma elevada plasticidade, reagindo quando desafiadas por estímulos fisiológicos e patológicos. Assim, a plasticidade mitocondrial é definida como alterações na atividade mitocondrial, no conteúdo e capacidade oxidativa devido a alterações metabólicas, induzidas por várias condições patofisiológicas (como por exemplo, envelhecimento e cancro) (69,70).

O músculo esquelético apresenta duas subpopulações mitocondriais distintas que coexistem numa rede dinâmica, mas que diferem de acordo com a localização subcelular, propriedades morfológicas, bioquímicas e funcionais. As mitocôndrias subsarcolemas (SS) encontram-se localizadas abaixo do sarcolema, têm forma lamelar e grandes dimensões. Já as mitocôndrias intermiofibrilares (IMF) são mais pequenas e redondas e localizam-se entre

os filamentos contrácteis (41,71). As IMF apresentam maior atividade da cadeia respiratória e fornecem a maioria do ATP para a contração muscular. As SS apresentam maior *turnover* proteico em situações atrofia muscular (68). Em termos de quantidade, as SS representam cerca de 20% das mitocôndrias do músculo esquelético enquanto que as IMF representam as restantes 80% (41). Estas propriedades divergentes parecem indicar que estas duas populações mitocondriais estão diferentemente envolvidas na patogénese da caquexia associada ao cancro. No entanto, não existem dados que permitam avaliar a diferente suscetibilidade das populações de mitocôndrias do músculo esquelético à caquexia associada ao cancro (18).

A progressão da caquexia associada ao cancro está intimamente ligada à disfunção mitocondrial. Vários estudos, utilizando diferentes abordagens, têm demonstrado alterações nos mecanismos moleculares subjacentes à disfunção mitocondrial do músculo esquelético durante a caquexia associada ao cancro (10,15,17,38,72–78) (ver Figura 3). Independentemente da heterogeneidade dos modelos animais usados para estudar a caquexia associada ao cancro (tipo, local e tamanho do tumor) tem sido consistentemente descrita uma perda da capacidade oxidativa muscular (11,38,79). Várias evidências no músculo esquelético em humanos e em modelos animais de caquexia associada ao cancro revelaram uma diminuição do conteúdo mitocondrial, mitocôndrias com morfologia alterada, diminuição da atividade das enzimas do ciclo de Krebs, do consumo de O₂, da síntese de ATP e um aumento da apoptose (10,12,72).



Figura 3: Visão geral das alterações moleculares subjacentes à disfunção mitocondrial do músculo esquelético durante a caquexia associada ao cancro (10,15,17,38,72–78).

O sistema de controlo de qualidade proteico mitocondrial é crucial para a funcionalidade do músculo esquelético, uma vez que este órgão possui uma baixa taxa de regeneração. Este controlo é realizado através da coordenação de uma rede complexa de processos celulares e permite manter a homeostasia mitocondrial (23). Assim, a integridade da estrutura e funcionalidade mitocondrial depende da eficiência dos processos de controlo de homeostasia mitocondrial, incluindo sistema antioxidante mitocondrial, sistema de controlo de qualidade proteico mitocondrial e *turnover* mitocondrial (biogénese, mitofagia). A primeira linha de defesa provém do sistema antioxidante mitocondrial que atua no sentido de prevenir danos oxidativos nas mitocôndrias (80). Para além disso, a mitocôndria possui um sistema de controlo de qualidade proteica interno que permite eliminar/reparar as proteínas danificadas e que é constituído por chaperonas (Hsp60, Hsp70, Hsp78, entre outras), que atuam ao nível da matriz mitocondrial, e proteases (Lon, *i*-AAA e *m*-AAA proteases), que atuam ao nível da matriz e membrana interna mitocondriais (81). Além disso, o *turnover* mitocondrial tem um papel vital, removendo as mitocôndrias disfuncionais através da (auto)mitofagia e sintetizando *de novo* mitocôndrias (biogénese). Por isso, o comprometimento deste sistema de controlo de qualidade proteico mitocondrial resulta

numa acumulação de mitocôndrias disfuncionais capazes de produzir mais ROS, diminuir a produção de ATP, ativar a apoptose e necrose e/ou libertar componentes mitocondriais (mtHsp60, mtDNA modificado) para o citosol e desencadear a inflamação (16), como representado na Figura 4. Devido às suas responsabilidades vitais, o comprometimento dos processos de controlo mitocondrial tem sido sugerido como um mecanismo que contribui para a perda de massa muscular associada a várias condições de atrofia muscular (80).

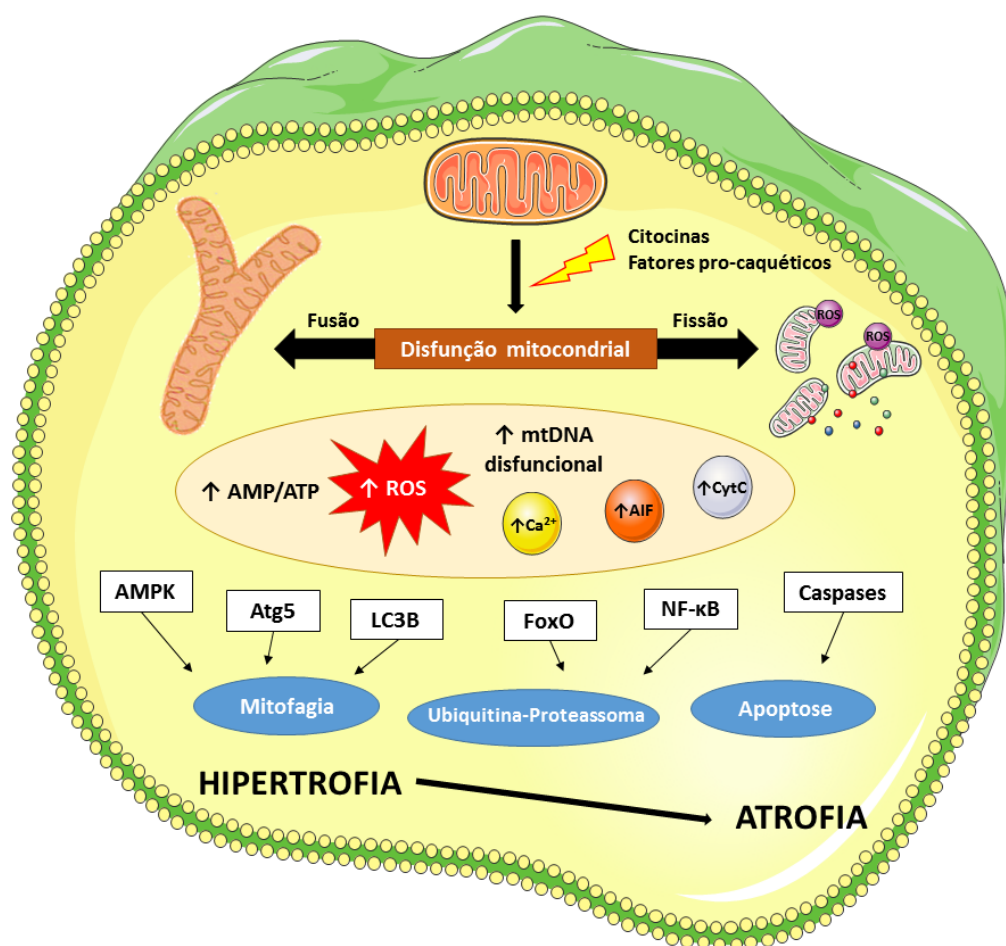


Figura 4: Mecanismos moleculares subjacentes à disfunção mitocondrial do músculo esquelético que podem estar associados à regulação da perda de massa muscular subjacente à caquexia. A progressão da caquexia associada ao cancro está associada à disfunção dos processos de controlo de qualidade mitocondriais (ex. fusão, dinâmica, fissão), o que conduz à acumulação de mitocôndrias disfuncionais. Estas podem apresentar morfologia anormal, diâmetros exacerbados ou tamanhos mais reduzidos, acompanhado de baixa eficiência energética. Este quadro resulta de stresse energético, produção e acumulação de ROS, cálcio e fatores pro-apoptóticos. Várias vias catabólicas são ativadas em resposta a estes estímulos, resultando em atrofia muscular generalizada (adaptado de (8,80)).

Figura elaborada com base no *Servier Medical Art* (<http://www.servier.com/Powerpoint-image-bank>).

O comprometimento do controlo da qualidade proteica mitocondrial pode levar à acumulação de mitocôndrias disfuncionais, com diâmetros exacerbados, morfologia alterada e baixa capacidade bioenergética (80). As mitocôndrias disfuncionais promovem o stresse oxidativo, aumentando a produção de ROS e, conseqüentemente, amplificando os danos mitocondriais. Posteriormente, são ativadas as vias de sinalização da apoptose e da proteólise levando à atrofia do músculo esquelético e, conseqüentemente, ao comprometimento do metabolismo oxidativo do músculo (23). O possível impacto da diminuição de ATP em favor do *turnover* proteico é refletido pela concomitante diminuição da capacidade bioenergética de todo o músculo e aumento do catabolismo proteico, contribuindo para a atrofia muscular generalizada (72), como é ilustrado na Figura 4.

2.1 Contribuição da biogénese e mitofagia para a caquexia associada ao cancro

As mitocôndrias das miofibrilas estão sujeitas a processos de regulação que permitem a adaptação a um ambiente celular em constante mudança. Estes processos incluem a fusão, fissão e *turnover* mitocondriais (balanço entre biogénese e mitofagia) e são essenciais para o controlo de qualidade mitocondrial e manutenção da homeostasia celular (82). Distúrbios em qualquer um destes processos têm impacto no metabolismo do músculo esquelético. O fenótipo do músculo esquelético na caquexia associada ao cancro é caracterizado por uma redução do número de mitocôndrias (23,38), uma diminuição da expressão de fatores envolvidos na biogénese e aumento da mitofagia (23).

A biogénese mitocondrial é controlada por uma família de co-ativadores que incluem a PGC-1 α e PGC-1 β (41). A PGC-1 α interage diretamente com fatores de transcrição que controlam o processo de biogénese e regulam a utilização de substratos para a produção energética, estimulando a β -oxidação de ácidos gordos, ciclo de Krebs e fosforilação oxidativa (83). O controlo transcricional da PGC-1 α envolve proteínas mitocondriais, Tfam, NRF-1 e NRF-2. O Tfam tem um papel central na indução e regulação dos processos transcricionais do genoma mitocondrial (84). O NRF-1, para além de controlar processos de transcrição mitocondrial, regula a biossíntese do grupo heme, a biossíntese e importação proteica e agrupamento das subunidades ribossomais (85,86). Por sua vez, NRF-2 está

envolvido na transcrição de citocromo c oxidase, o complexo IV da cadeia respiratória (85). Uma diminuição da expressão da PGC-1 α , indicativo de diminuição da biogênese, tem sido observada no músculo esquelético de animais com caquexia associada ao cancro (15,23). O comprometimento da sinalização mediada por PGC-1 α também influencia o metabolismo proteico. Ao nível do músculo esquelético, PGC-1 α atenua a proteólise muscular através da via ubiquitina-proteassoma ao bloquear a atividade dos fatores FoxO e NF- κ B (87). O fator de transcrição Tfam também se encontra diminuído no músculo esquelético de animais caquéticos (38). Devido ao seu envolvimento na regulação do mtDNA, níveis baixos de Tfam sugerem um comprometimento da transcrição mitocondrial, o que afeta negativamente os processos de biogênese (11). A função da PGC-1 β é a de regular a fusão mitocondrial, controlando a expressão das mitofusinas 1 e 2 (Mfn1 e Mfn2) e *optic atrophy 1* (Opa1) (88), essenciais para o ótimo funcionamento deste processo. Em situações de caquexia associada ao cancro, os níveis de mRNA da Mfn1 parecem estar diminuídos (89). No entanto, em relação ao Mfn2 os resultados são contraditórios, tendo-se verificado um aumento dos níveis de mRNA de Mfn2 no músculo extensor longo em ratos inoculados com AH-130 Yoshida (73) e uma diminuição significativa da expressão da proteína Mfn2 no músculo *gastrocnemius* de ratos Apc^{+/-} (15).

A manutenção da homeostasia mitocondrial também requer a remoção das mitocôndrias disfuncionais através de um processo denominado mitofagia. O objetivo desta via é manter a integridade da célula, promovendo a eliminação de mitocôndrias disfuncionais que, caso contrário, seriam nocivas para a célula (90). Este processo está intimamente associado à dinâmica mitocondrial (91). A mitofagia é desencadeada pela interação de moléculas específicas da membrana mitocondrial externa com moléculas da membrana do autofagossoma (88,91), sendo que os intermediários-chave deste processo são as proteínas *PTEN-induced putative kinase 1* (PINK1) e Parkin (88,92). A mitofagia e a fissão mitocondrial são processos complementares em que a fissão fornece os substratos necessários à degradação lisossomal que se verifica na mitofagia. De uma forma geral, várias evidências indicam que o aumento de fissão e mitofagia contribuem para o fenótipo de caquexia associada ao cancro (11,15,23,88,91). No entanto, a fissão mitocondrial é mais prevalente nos estádios mais avançados da caquexia (15).

Ao nível molecular, modelos animais de caquexia associada ao cancro demonstram um aumento da expressão de genes relacionados com a autofagia (Atg's) tais como Atg7,

Atg5, *Bcl-2/adenovirus E1B interacting protein 3* (Bnip3) e *microtubule-associated protein 1 light chain 3 alpha* (Map1lc3a) (89). A *Atg7* é de particular relevância na via autofágica-lisossomal, uma vez que a sua deleção resulta em atrofia do músculo esquelético, anomalias mitocondriais e desorganização ao nível dos sarcômeros (93). Por sua vez, o aumento de *Atg5* no músculo atrofiado é acompanhado de um aumento na proteína de fissão mitocondrial 1 (Fis1), reguladora de processos de fissão mitocondrial (94). A Bnip3 está implicada nos processos de apoptose e mitofagia, sendo que a sua translocação para a mitocôndria destabiliza o potencial da membrana. A influência de Map1lc3a e de *Atg5* como reguladores da autofagia foi recentemente descrita no contexto da atrofia muscular (11,94). A proteína *microtubule-associated protein 1 light chain 3 isoform b* (LC3B) existe em duas isoformas, a LC3BI no citosol e a sua derivada proteolítica LC3BII na membrana do autofagossoma (95). A LC3B é inicialmente processada a LC3BI pela *Atg4*, uma protease de cisteína, deixando um resíduo de glicina exposto para uma posterior conjugação com fosfatidiletanolamina (PE), dando origem à LC3BII. Após a fusão do autofagossoma com o lisossoma, esta proteína é degradada (96). Para além destes reguladores, as vias que controlam o *turnover* proteico FoxO e Akt-mTOR (ver Figura 2) também potenciam a mitofagia no músculo esquelético (41). Certos parâmetros morfológicos, tais como o *swelling* e a redução do número de cristas, têm sido observados no músculo esquelético de animais com caquexia, indicando disfunção mitocondrial (73). A manutenção do balanço biogénese-mitofagia torna-se, portanto, essencial na manutenção da homeostasia mitocondrial e celular, na remoção de mitocôndrias disfuncionais e nocivas para o ambiente celular, e na síntese de mitocôndrias *de novo* de acordo com as necessidades bioenergéticas da célula (8).

3. O exercício físico como estratégia terapêutica para a caquexia associada ao cancro

No sentido de contrariar a adaptação muscular que se verifica na caquexia associada ao cancro, várias abordagens terapêuticas, farmacológicas e/ou não-farmacológicas têm sido usadas, mas com eficácia limitada (26). No contexto das abordagens não-farmacológicas, a prática de exercício físico tem sido recomendada para prevenir e/ou tratar a caquexia

associada ao cancro (25,45,97). O exercício físico parece contribuir para a manutenção da massa muscular através de vários mecanismos, nomeadamente através da modulação dos níveis de citocinas inflamatórias, da redução do stresse oxidativo, do aumento da síntese proteica, diminuição da proteólise e modulação da plasticidade mitocondrial (21).

O exercício físico exerce um efeito anti-inflamatório através do aumento dos níveis da citocina anti-inflamatória IL-10, que por sua vez inibe a produção de IL-1 α , IL-1 β e TNF- α (98,99). O rácio IL-10/TNF- α é de particular relevância, uma vez que a prática de exercício parece estar associada ao seu aumento e, conseqüentemente, a um efeito anti-inflamatório (100). Esta resposta anti-inflamatória poderá atenuar o processo de atrofia muscular, tornando o exercício físico uma medida a adotar em pacientes que sofrem de caquexia (22).

Em termos gerais, o exercício físico pode ser classificado como exercício de reduzida tensão mecânica e longa duração (ERTMLD), também conhecido como exercício de *endurance*, e exercício de elevada tensão mecânica e curta duração (EETMCD), também conhecido por exercício de resistência (101). O ERTMLD estimula maioritariamente a biogénese mitocondrial e respiração aeróbia, enquanto que o EETMCD aumenta a massa e força musculares, estimulando a hipertrofia (102). A prática de exercício físico desencadeia uma resposta metabólica e estrutural no músculo esquelético, esquematizada na Figura 5, induzindo adaptações altamente específicas e dependentes de cada tipo de exercício, da sua frequência, intensidade e duração (26).

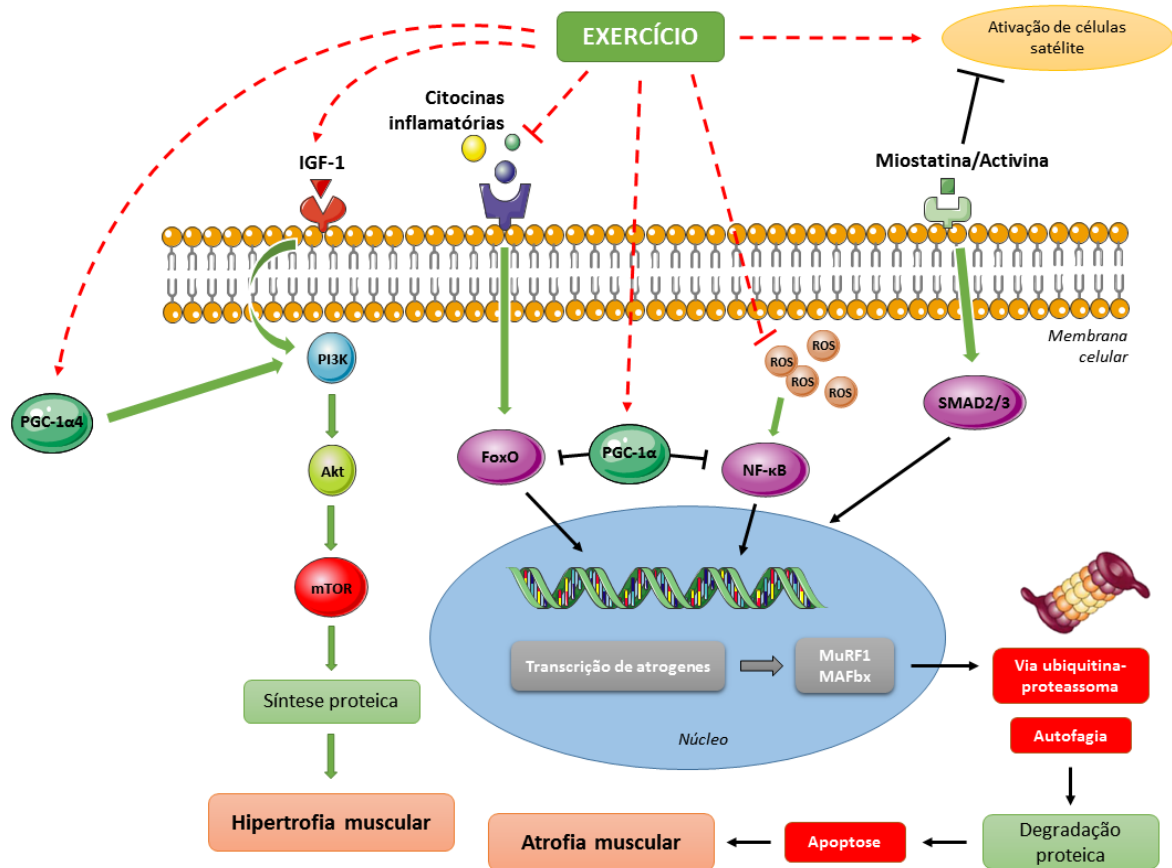


Figura 5: Efeitos do exercício físico nas vias de sinalização responsáveis pela caquexia associada ao cancro. A presença de ROS e citocinas inflamatórias estimula várias vias de sinalização responsáveis pela proteólise no músculo, nomeadamente a via ubiquitina-proteassoma e a autofagia, para além de suprimir a atividade de síntese proteica da via Akt-mTOR. A miostatina é também responsável por intensificar a transcrição de atrogenes e inibir a ativação das células satélite. A prática de exercício físico, no entanto, contribui para atenuar as vias proteolíticas, estabilizando e até intensificando a síntese proteica. O seu efeito é verificado ao nível da inibição da via da miostatina, ao nível da estimulação da via da IGF-1, contribuindo para um aumento da síntese proteica, e na indução da PGC-1 α e PGC-1 α 4, que estimulam a via Akt-mTOR e diminuem assim o estado catabólico no músculo (adaptado de (26)).

Figura elaborada com base no *Servier Medical Art* (<http://www.servier.com/Powerpoint-image-bank>).

A prática de EETMCD estimula maioritariamente a síntese proteica no músculo esquelético, nomeadamente das proteínas miofibrilares actina e miosina, promovendo um aumento na área da secção transversal das fibras musculares esqueléticas e hipertrofia muscular (103). Este facto deve-se em parte ao aumento da expressão da IGF-1, um dos reguladores da hipertrofia muscular que se encontra aumentada após 48h da última sessão de EETMCD (104). Por sua vez, a IGF-1 induz a expressão seletiva da via Akt-mTOR,

contrariando a perda de massa muscular observada em pacientes oncológicos. Tem sido sugerido um aumento da força muscular em cerca de 41%, um aumento da massa muscular em aproximadamente 1% e, conseqüentemente, uma melhor aptidão física (19). Tem sido também sugerida uma remodelação das fibras musculares para um fenótipo progressivamente mais oxidativo, em particular advindo da prática de ERTMLD, através do aumento do conteúdo mitocondrial e capilarização muscular (105). No entanto, os estudos que avaliam os benefícios do EETMCD são ainda limitados, comparativamente aos estudos sobre o efeito do ERTMLD (26).

O ERTMLD aumenta a atividade de enzimas antioxidantes tais como superóxido dismutase, glutathione peroxidase e catalase, protegendo o músculo esquelético contra danos oxidativos provocados por ROS (106). O ERTMLD regula os processos relacionados com o *turnover* mitocondrial, aumentando ou mantendo o conteúdo mitocondrial no músculo esquelético. Este tipo de exercício estimula a funcionalidade mitocondrial e o aumento da biogénese mitocondrial no músculo esquelético (21). Assim, estas alterações são importantes porque estão em contraste das alterações que ocorrem na caquexia associada ao cancro. O exercício físico induz um aumento da atividade da OXPHOS, tendo sido observado um aumento na atividade do complexo II (succinato desidrogenase), assim como um aumento na atividade do complexo IV (citocromo c oxidase). Tem sido também sugerido um aumento mais acentuado da atividade do complexo II nas mitocôndrias SS em comparação com as mitocôndrias IMF, sugerindo que as primeiras se adaptam com mais facilidade e rapidez ao exercício físico de longa duração (18).

O exercício físico induz um aumento da expressão da PGC-1 α , com conseqüente supressão de FoxO, miostatina e atrogenes (24,87). A expressão dos genes de NRF-1, NRF-2 e Tfam no músculo esquelético também aumenta com o ERTMLD, contribuindo para a eficácia dos processos de biogénese mitocondrial (107). A prática de ERTMLD é também suficiente para aumentar a expressão de Mfn1, Mfn2 e a fosforilação da proteína relacionada com a dinamina 1 (Drp1) (108), proteínas que regulam a fusão mitocondrial (82). Por outro lado, os níveis de mRNA de Drp1 e Mfn2 encontram-se diminuídos em ratos sujeitos a 3 semanas de inatividade física dos membros inferiores (109). O impacto do exercício físico na mitofagia no músculo esquelético só agora começa a ser estudado. Algumas evidências sugerem que a prática de ERTLMD induz a mitofagia através da indução da expressão das proteínas Atg6 e Atg7 (21) e LC3BII, Drp1, Parkin e Bnip3 (110). A prática de exercício

físico representa uma intervenção promissora na caquexia associada ao cancro. No entanto, por vezes existem limitações na implementação do programa de exercício físico em doentes oncológicos, nomeadamente na definição da duração, modo e intensidade de exercício adequados ao perfil clínico (108).

III. Objetivos

A caquexia associada ao cancro caracteriza-se pela perda de peso excessiva e involuntária, comprometendo a qualidade de vida do paciente oncológico. Esta síndrome está associada a um acentuado catabolismo muscular esquelético devido à inflamação sistémica proeminente, com impacto na homeostasia e no balanço energético no músculo esquelético. Assim, no sentido de estudar o potencial efeito terapêutico do ERTMLD na plasticidade mitocondrial do músculo esquelético na caquexia associada ao cancro, foi usado um modelo animal de carcinoma urotelial submetido a 13 semanas de exercício físico. Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivos específicos:

- i. Caracterizar a resposta animal à exposição ao agente carcinogénico *N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)-nitrosamine* (BBN) e/ou exercício físico;
- ii. Avaliar o impacto da caquexia associada ao cancro e/ou do exercício físico nas alterações morfológicas do músculo esquelético;
- iii. Compreender o impacto da caquexia associada ao cancro e/ou do exercício físico na plasticidade mitocondrial do músculo esquelético, dando ênfase aos mecanismos de mitofagia e de biogénese mitocondrial.

IV. Materiais e métodos

1. Reagentes

O carcinogénico *N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)-nitrosamine* (BBN) foi obtido da *Sigma Chemical Co.* (Madrid, Espanha). Os anticorpos mouse monoclonal anti-Bnip3 (ab10433), rabbit policlonal anti-LC3B (ab48394), rabbit policlonal anti-PGC-1 α (ab54481), rabbit policlonal anti-GAPDH (ab9485) e mouse monoclonal anti-ATPB (ab14730) foram adquiridos da *Abcam* (Cambridge, UK). *MitoProfile® Total OXPHOS Cocktail* Western blotting kit rabbit (ab110413) foi adquirido da *Abcam* (Cambridge, UK). Rabbit policlonal anti-mtTFA (sc-28200) foi adquirido da *Santa Cruz, INC* (CA, USA). Rabbit monoclonal anti-Sirt3 (#2627) foi adquirido da *Cell Signalling Technology* (MA, USA).

2. Procedimento experimental

No sentido de concretizar os objetivos propostos para este estudo delineou-se o desenho experimental apresentado na Figura 6, onde estão descritos os grupos experimentais bem como a abordagem metodológica utilizada que se encontra descrita com maior pormenor nos pontos que se seguem.

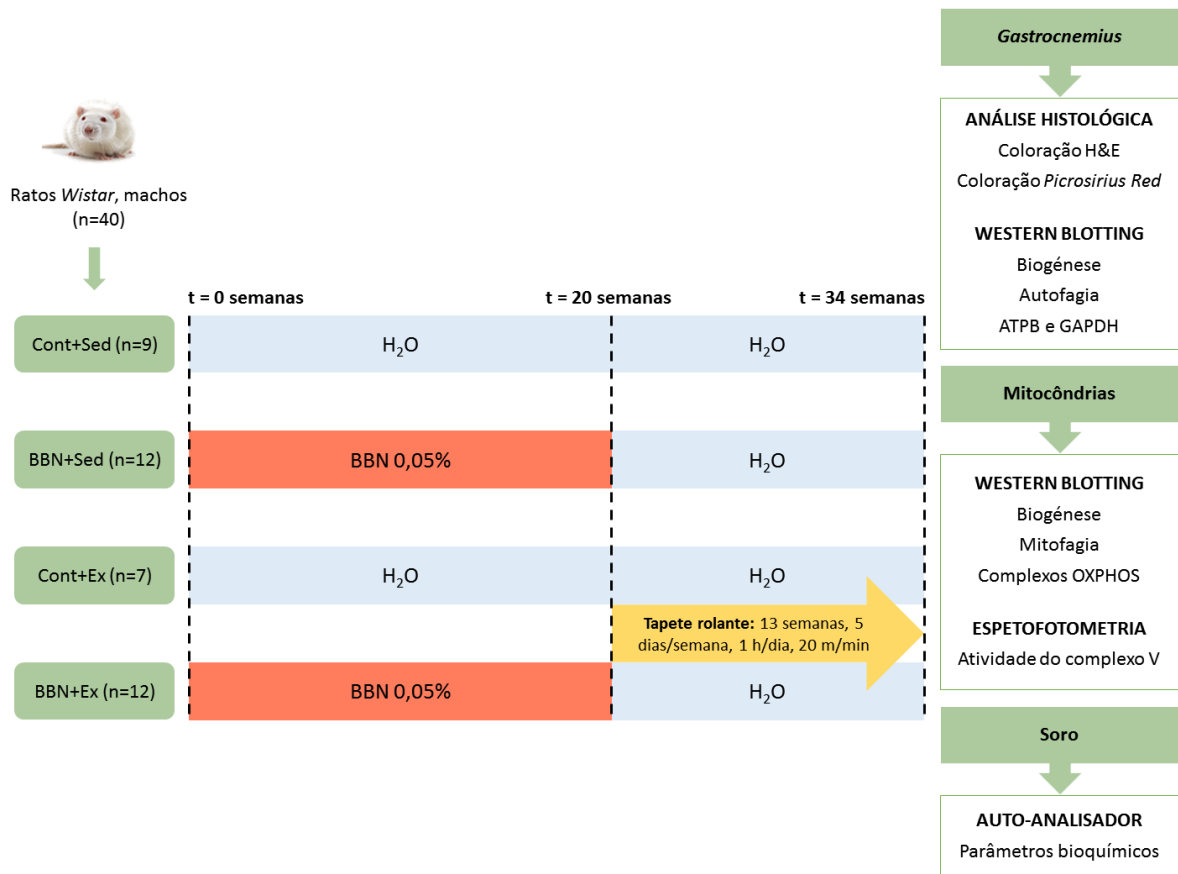


Figura 6: Visão geral do procedimento experimental efetuado no presente estudo. Os animais foram divididos em 4 grupos experimentais: Cont+Sed, BBN+Sed, Cont+Ex e BBN+Ex, tendo sido induzido cancro urotelial nos animais dos grupos BBN através do consumo de água contendo o agente carcinogénico BBN durante 20 semanas. Após a indução do carcinoma urotelial os animais dos grupos Ex foram submetidos a um protocolo de exercício durante 13 semanas.

2.1 Protocolo animal

O protocolo animal envolveu 40 ratos *Wistar* machos, provenientes dos laboratórios de Harlan (Barcelona, Espanha). Durante o protocolo experimental, os animais foram colocados em gaiolas, em grupos de 4, num ambiente controlado, temperatura constante de 22 ± 2 °C, humidade relativa de $60 \pm 5\%$, num ciclo diário de 12 horas dia-noite, com acesso *ad libitum* a comida (dieta padrão de laboratório 4RF21® (Mucedola, Itália)) e a água. Após uma semana de aclimatização, os animais foram divididos aleatoriamente em 4 grupos experimentais: Controlos Sedentários (Cont+Sed, n=9), Controlos Exercitados (Cont+Ex, n=7), com Carcinoma Urotelial Sedentários (BBN+Sed, n=12) e com Carcinoma Urotelial

Exercitados (BBN+Ex, n=12). Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética para Experimentação Animal, Direção Geral de Alimentação e Veterinária e foram realizados de acordo com a Comissão Europeia Recomendação 2007/526/CE.

2.2 Indução de cancro urotelial e protocolo de exercício físico

Em dois grupos de animais foi induzido carcinoma urotelial (BBN+Sed e BBN+Ex) por exposição a BBN na água, durante um período de 20 semanas. De forma a averiguar o efeito terapêutico do exercício físico, dois grupos de animais (Cont+Ex e BBN+Ex) realizaram um programa de treino de *endurance* (ERTMLD) em tapete rolante (Treadmill Control LE 8710, Harvard Apparatus, USA) a partir da semana 20, quando já são expectáveis lesões uroteliais (111). Nas primeiras duas semanas, a duração e intensidade do treino aumentou gradualmente até 1 h/dia, 5 dias/semana, a uma velocidade de 20 m/min, programa que foi mantido durante 13 semanas. No final do protocolo os animais foram eutanizados por administração intraperitoneal de quetamina/xilazina (ImaIgen® e Rompun®, respetivamente), e recolheram-se amostras de sangue total. Todos os tumores foram contabilizados e removidos para análise histológica. O músculo *gastrocnemius* foi recolhido, pesado e armazenado a -80 °C para posterior análise bioquímica. Secções de músculo *gastrocnemius* foram imediatamente preparadas para análise histológica.

3. Análise de parâmetros bioquímicos no soro

O sangue foi recolhido para tubos secos e centrifugado a 5000 g durante 10 minutos, tendo sido armazenado a -80 °C para posteriores análises. No soro obtido analisaram-se os parâmetros albumina, triglicéridos (TG), proteína total, colesterol, glucose e atividades da alanina transaminase (ALAT), fosfatase alcalina (ALP), creatina cinase (CK) e aspartato aminotransaminase (ASAT). As análises foram feitas em duplicado, num autoanalisador (PRESTIGE 24i, Cormay PZ).

4. Análise histológica do músculo *gastrocnemius*

4.1 Preparação da amostra

Pequenos pedaços cúbicos de músculo *gastrocnemius* foram imersos numa solução fixadora de paraformaldeído 4% (v/v) em tampão PBS 0,1 M pH 7,2 durante 20 horas a 4 °C. Após as lavagens com tampão PBS 0,1 M pH 7,2, as secções de tecido foram desidratadas com soluções de etanol com concentrações crescentes (70%-100%) durante 60 minutos à temperatura ambiente. Foram então diafinizadas com xileno durante 1 hora e impregnadas em parafina, utilizando numa primeira fase soluções de xileno:parafina em diferentes proporções e, numa segunda fase, parafina pura.

Secções semi-finas (5 µm) foram obtidas por corte dos blocos de tecidos num micrótopo manual (Leica RM 2125). Estes cortes foram distendidos em banho-maria (38 °C) e colocados em lâminas para microscopia ótica. Na Figura 7 encontra-se um esquema geral do procedimento seguido no presente estudo.

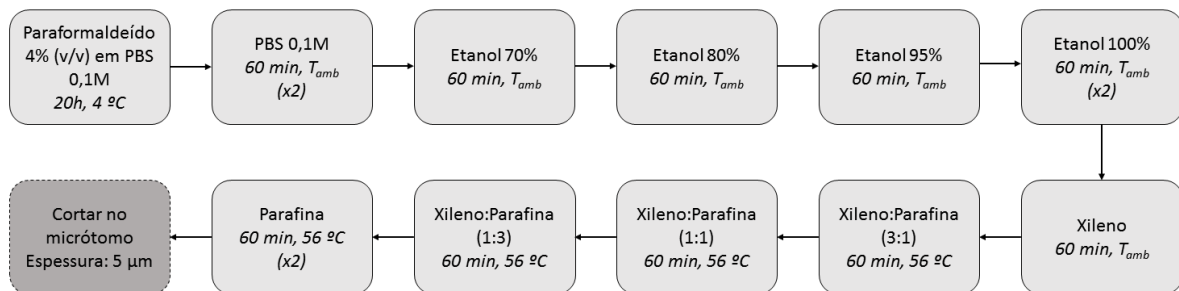


Figura 7: Protocolo de processamento de amostras em parafina para microscopia ótica.

Uma vez montados nas lâminas, os cortes foram colocados numa estufa a 25 °C *overnight*, para secar e melhorar a fixação. Em seguida, as lâminas foram desparafinizadas utilizando xileno e hidratadas com soluções de etanol com concentrações decrescentes (100%-75%) e posteriormente água. Os cortes foram corados com a coloração de Hematoxilina-Eosina (H&E) e coloração de *Picrosirius Red*, cujos passos experimentais se encontram descritos resumidamente na Figura 8 e nos pontos 4.2 e 4.3.

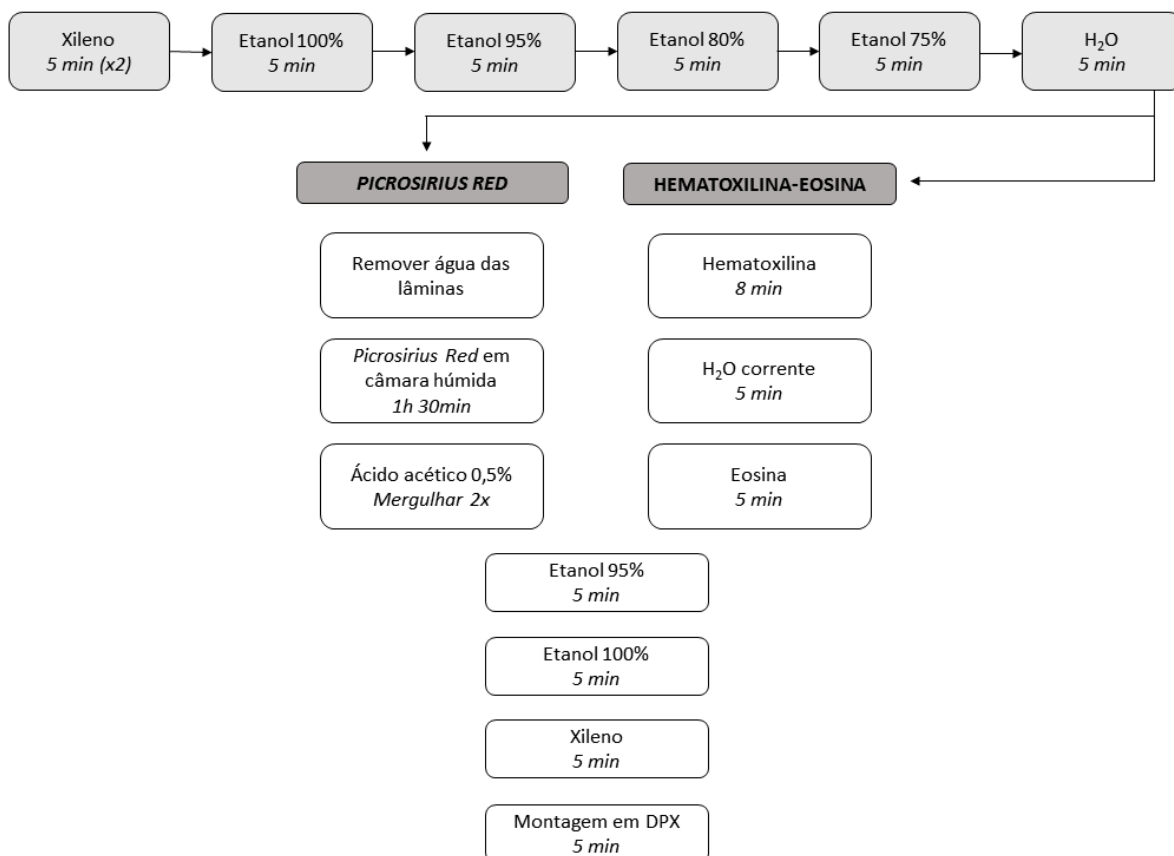


Figura 8: Protocolo para as colorações de Hematoxilina-Eosina e *Picrosirius Red* efetuadas neste estudo.

4.2 Coloração por Hematoxilina-Eosina

Após as amostras terem sido desparafinizadas e hidratadas, foram coradas durante aproximadamente 8 minutos com corante Hematoxilina, seguido de uma lavagem com água corrente por 5 minutos, e 5 minutos no corante Eosina. Os cortes permaneceram 5 minutos nos álcoois 95% e 100 %, respetivamente, e por último foram emergidos em xileno durante 5 minutos. Para a montagem das lâminas foi utilizado meio de montagem contendo distireno, fosfato de tricresilo e xileno (DPX). A análise histológica dos cortes transversais de *gastrocnemius* foi realizada utilizando um microscópio ótico (Axio Imager A1, Carl Zeiss; Alemanha) com câmara fotográfica acoplada (AxioCam MRc5, Carl Zeiss; Alemanha), onde se obtiveram fotografias na objectiva de 40x. As imagens foram analisadas com o *software* ImageJ v1.50i (Domínio público). Foram analisadas 988 ± 305 fibras musculares por grupo.

4.3 Coloração por *Picrosirius Red*

Após a desparafinização e hidratação, os cortes de músculo *gastrocnemius* foram corados com *Picrosirius Red* de acordo com o método descrito por Sweat *et al.* (112). A técnica de *Picrosirius Red* cora o colagénio a vermelho e o tecido muscular a amarelo. Efetuou-se a incubação em 0,1% de *Picrosirius Red* dissolvido em ácido pícrico aquoso saturado, durante 1 hora e 30 minutos. Os cortes foram depois imergidos em 0,5% de ácido acético, desidratados com etanol e lavados em xileno. Para a montagem das lâminas foi utilizado DPX. A análise histológica foi realizada utilizando um microscópio ótico (Axio Imager A1, Carl Zeiss; Alemanha) com câmara fotográfica acoplada (AxioCam MRc5, Carl Zeiss; Alemanha), onde se obtiveram fotografias na objectiva de 40x. As imagens foram analisadas com o *software* Image-Pro Plus v6.0.0.260 (Media Cybernetics, Inc.) pela quantificação da área percentual de colagénio (vermelha) por tecido muscular (amarelo).

5. Isolamento de mitocôndrias do músculo esquelético

O isolamento de mitocôndrias do músculo *gastrocnemius* foi realizado usando o método convencional de centrifugação diferencial. Todos os procedimentos de isolamento de mitocôndrias foram realizados a uma temperatura entre os 0 °C e os 4 °C.

Os músculos *gastrocnemius* foram colocados num meio de isolamento contendo 20 mM MOPS, 1 mM EGTA, 110 mM KCl e 2 mM PMSF pH 7,5 com 0,1% BSA *fat-free*. O tecido foi cortado em pequenas porções, limpo e ressuspensionado numa solução gelada de meio de isolamento contendo tripsina na concentração de 0,25 mg de enzima por cada grama de tecido durante 20 minutos a 4 °C. De seguida, o tecido foi cuidadosamente homogeneizado com o Potter-Elvehjem da Teflon. A suspensão foi incubada durante 1 minuto no gelo e novamente homogeneizada. De seguida, centrifugou-se o homogeneizado a 14500 g durante 10 minutos a 4 °C para remover a protease tripsina e o *pellet* resultante foi ressuspensionado novamente em meio de isolamento antes de se centrifugar a suspensão obtida a 750 g durante 10 minutos a 4 °C, tendo sido retirada uma alíquota para posteriores análises bioquímicas. O sobrenadante resultante foi centrifugado a 12500 g durante 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante

foi decantado e o *pellet* resultante foi delicadamente ressuspendido em meio de lavagem contendo 250 mM de sacarose, 10 mM de HEPES, pH 7,4.

6. Determinação da concentração de proteína total

A determinação da concentração de proteína total presente nos homogeneizados de músculo *gastrocnemius* e na fracção mitocondrial foi efetuada com o método colorimétrico “*RC DC Protein Assay*” da Bio-Rad. Este método baseia-se numa modificação do protocolo de Lowry *et al.* (113), permitindo a quantificação de proteína na presença de agentes redutores e detergentes. Os valores de densidade ótica foram determinados a 750 nm num espectrofotómetro (Labsystems iEMS Reader MF). Simultaneamente, foi efetuada uma curva de calibração utilizando-se para o efeito padrões de albumina sérica bovina (BSA) com diferentes concentrações.

7. Determinação da atividade do complexo V da cadeia respiratória mitocondrial

A atividade da ATP sintase (complexo V) foi determinada de acordo com Simon *et al.* (114). As mitocôndrias foram incubadas num tampão de reação (10 mM de Tris-HCl, 3 mM de MgCl₂, 0,2 M de KCl pH 8,4) com ou sem oligomicina durante 2 minutos após o que se adicionou 0,1 M de ATP pH 7,0 durante 30 segundos. A reação foi parada pela adição de 3 M de TCA. Após centrifugação a 9000 g durante 10 minutos a 4 °C retirou-se o sobrenadante e incubou-se com uma solução teste (3,3 g de molibdato de amónio, 4 g de sulfato ferroso em 500 mL de 0,37 M de ácido sulfúrico) durante 15 minutos. Paralelamente foram preparados padrões de fosfato inorgânico para a realização de uma curva padrão utilizada para determinar a quantidade de fosfato libertado pela hidrólise do ATP. Mediu-se a absorvância a 610 nm. A atividade da ATP sintase foi expressa em µmol Pi/min/mg de proteína.

8. Análise da expressão proteica por Western blotting

Um determinado volume de amostra (homogeneizado total ou extrato mitocondrial) correspondente a 30 µg de proteína foi diluído 1:2 em tampão de redução (0,5 M Tris-HCl, pH 6,8; 10% SDS (m/v); 20% glicerol (v/v); 10 mM β-mercaptoetanol; 0,05% azul de bromofenol (m/v)) e incubado a 100 °C durante 5 minutos. Amostras reduzidas e desnaturadas de cada um dos grupos experimentais foram aplicadas em géis de SDS-PAGE 12,5%, preparado segundo Laemmli (115). Após a separação, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Whatman®, Protan®) por *electroblotting* a 200 mA durante 2h em tampão de transferência (25 mM Tris, 192 mM glicina, pH 8,3 e 20% metanol). Após a transferência, as membranas foram coradas com *Ponceau S* para controlo da proteína aplicada e transferida, lavadas com água destilada, e posteriormente bloqueadas com 5% (m/v) de leite magro em pó em tampão Tris-salino-Tween (TBS-T; 100 mM Tris pH 8,0; 1,5 mM NaCl; 0,5% Tween 20) durante 1h à temperatura ambiente, de forma a evitar a ligação não específica do anticorpo. Posteriormente, as membranas foram incubadas com uma solução de anticorpo primário diluído em solução de bloqueamento específico para a OXPHOS (ab110413, 1:1000), mtTFA (sc-28200, 1:1000), Bnip3 (ab10433, 1:1000), LC3B (ab48394, 1:1000), PGC-1α (ab54481, 1:2000), ATPB (ab14730, 1:1000), GAPDH (ab9485, 1:1000) e Sirt3 (#2627, 1:1000), tendo permanecido em agitação *overnight* à temperatura de 4 °C. Após 3 lavagens de 10 minutos com TBS-T, as membranas foram incubadas com uma solução de anticorpo secundário *anti-rabbit* ou *anti-mouse*, contendo a enzima *Horseradish peroxidase* (HRP), diluídas 1:5000 em solução de bloqueamento durante 1h à temperatura ambiente. Após novas lavagens com TBS-T, as membranas foram expostas ao substrato enzimático (*Clarity Western ECL Substrate*, Bio-Rad, USA) e digitalizadas no sistema ChemiDoc (Bio-Rad, USA). A intensidade das bandas foi determinada utilizando o *software* ImageLab v4.1 (Bio-Rad Laboratories). As densidades óticas obtidas foram expressas em unidades arbitrárias.

9. Análise estatística

Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão para as variáveis de cada grupo experimental. O teste *Kolmogorov-Smirnov* foi usado para testar a normalidade dos dados. O teste *Kruskal-Wallis* seguido da aplicação do teste de *Dunns* foi usado para os dados com distribuição não-normal (área da secção transversal de fibras musculares, etc.). A análise de significância estatística das diferenças entre grupos experimentais para as variáveis com distribuição normal efetuou-se usando o teste de análise de variância *2-Way ANOVA* seguido da aplicação do teste *Tukey* post-hoc de comparação múltipla. O nível de significância estabelecida foi de $p < 0,05$. Para a análise dos dados recorreu-se ao programa GraphPad Prism v6.01 (GraphPad software, Inc.).

V. Resultados

1. Caracterização da resposta animal à exposição ao BBN e/ou à prática de ERTMLD

Todos os animais expostos ao agente carcinogénico desenvolveram carcinoma urotelial ao passo que os animais Controlo não revelaram nenhuma alteração histopatológica no urotélio (dados não apresentados). Pela análise da Tabela 1, pode-se observar que no final do protocolo experimental os animais do grupo BBN apresentaram um peso corporal significativamente menor, em aproximadamente 9%, comparativamente aos animais do grupo Controlo (Cont+Sed vs. BBN+Sed; $p < 0,05$). O programa de 13 semanas de ERTMLD não teve um impacto significativo no peso corporal dos animais com cancro (BBN+Sed vs. BBN+Ex). No entanto, a prática de ERTMLD nos animais saudáveis promoveu um aumento tendencial de peso corporal de 4% (Cont+Sed vs. Cont+Ex; $p > 0,05$). A exposição ao BBN e/ou à prática de ERTMLD não promoveu alterações estatisticamente significativas na massa do músculo *gastrocnemius*, no entanto, a prática de ERTMLD promoveu um aumento estatisticamente significativo de aproximadamente 8% do rácio massa de *gastrocnemius*/peso corporal nos animais com cancro urotelial (Cont+Ex vs. BBN+Ex; $p < 0,05$). 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 quatro grupos experimentais em termos de peso corporal, da massa de músculo *gastrocnemius* e do rácio massa de *gastrocnemius*/peso corporal.

Grupos Parâmetros	Cont+Sed	BBN+Sed	Cont+Ex	BBN+Ex
Peso corporal (g)	484,80 ± 31,90	440,70 ± 22,44*	502,70 ± 11,87	426,10 ± 33,51 ^{yyy}
Massa de <i>gastrocnemius</i> (g)	4,92 ± 0,46	4,66 ± 0,31	5,18 ± 0,53	4,86 ± 0,41
Rácio massa de <i>gastrocnemius</i> /peso corporal (mg g ⁻¹)	10,15 ± 0,68	10,57 ± 0,55	10,32 ± 1,20	11,42 ± 0,61 [‡]

Os valores são expressos em média ± desvio padrão (* $p < 0,05$ vs. Cont+Sed; [‡] $p < 0,05$ vs. Cont+Ex; ^{yyy} $p < 0,0001$ vs. Cont+Ex).

As alterações de peso corporal e massa muscular promovidas pela exposição ao BBN e/ou à prática de exercício físico foram acompanhadas por variações nos níveis de vários parâmetros bioquímicos séricos (Tabela 2). Os níveis de albumina e de proteína total, glucose e alanina transaminase (ALAT) encontram-se tendencialmente diminuídos nos animais do grupo BBN relativamente aos animais Controlo e a prática de exercício físico não promoveu alterações significativas nestes parâmetros. No entanto, a exposição ao BBN causou uma diminuição dos níveis séricos de colesterol e de creatina cinase (CK; Cont+Ex vs. BBN+Ex; $p < 0,05$) e de triglicérideos (TG; Cont+Ex vs. BBN+Ex; $p < 0,01$), só estatisticamente significativo entre os animais exercitados. Assim, observou-se uma redução significativa dos níveis de colesterol, TG e CK nos animais do grupo BBN+Ex quando comparados com os animais do grupo Controlo em 45%, 58% e 45%, respetivamente. Os níveis de fosfatase alcalina (ALP) e aspartato aminotransaminase (ASAT) mostraram-se significativamente diminuídos no grupo BBN relativamente ao grupo Controlo (Cont+Sed vs. BBN+Sed; $p < 0,01$ e $p < 0,05$, respetivamente), embora sem significado estatístico nos animais exercitados.

Tabela 2: Efeitos da exposição ao BBN e/ou ao ERTMLD nos parâmetros bioquímicos do soro dos quatro grupos experimentais.

Parâmetros \ Grupos	Cont+Sed	BBN+Sed	Cont+Ex	BBN+Ex
Albumina (g L ⁻¹)	25,79 ± 2,82	19,29 ± 4,15	26,71 ± 6,47	20,06 ± 8,54
Proteína total (g L ⁻¹)	39,54 ± 4,66	29,64 ± 6,95	42,64 ± 10,17	30,28 ± 12,99
Colesterol (mg dL ⁻¹)	40,39 ± 7,69	38,92 ± 13,09	55,16 ± 26,26	30,55 ± 12,78 [‡]
Glucose (mg dL ⁻¹)	127,8 ± 27,69	101,34 ± 30,24	163,59 ± 73,43	101,72 ± 67,63
TG (mg dL ⁻¹)	84,05 ± 35,85	75,41 ± 29,41	100,69 ± 31,54	42,12 ± 14,71 ^{‡‡}
ALP (U L ⁻¹)	54,04 ± 27,15	23,56 ± 8,60 ^{**}	37,60 ± 14,57	35,79 ± 18,20
CK (U L ⁻¹)	536,0 ± 187,0	339,38 ± 237,24	754,49 ± 248,53	413,46 ± 232,06 [‡]
ASAT (U L ⁻¹)	122,1 ± 71,23	47,41 ± 12,46 [*]	107,06 ± 44,59	84,67 ± 44,71
ALAT (U L ⁻¹)	45,73 ± 26,81	26,53 ± 7,99	44,21 ± 16,89	31,81 ± 12,06

Os valores são expressos em média ± desvio padrão (* $p < 0,05$ vs. Cont+Sed; ** $p < 0,01$ vs. Cont+Sed; [‡] $p < 0,05$ vs. Cont+Ex; ^{‡‡} $p < 0,01$ vs. Cont+Ex).

2. Caracterização morfológica do músculo *gastrocnemius* em resposta à exposição ao BBN e/ou à prática de ERTMLD

No sentido de estudar o efeito da exposição ao BBN e/ou à prática de ERTMLD na área da secção transversal (CSA) do músculo *gastrocnemius*, lâminas contendo secções transversais de músculo foram coradas com Hematoxilina-Eosina, sendo posteriormente analisadas recorrendo ao *software* ImageJ v1.50i (Domínio público). A análise morfométrica do músculo *gastrocnemius* (Figura 9) revelou uma diminuição estatisticamente significativa da CSA em 7% nos animais BBN+Sed ($1530 \pm 670 \mu\text{m}^2$ BBN+Sed vs. $1651 \pm 683 \mu\text{m}^2$ Cont+Sed; $p < 0,0001$) e de 10% nos animais BBN+Ex ($1555 \pm 577 \mu\text{m}^2$ BBN+Ex vs. $1727 \pm 624 \mu\text{m}^2$ Cont+Ex; $p < 0,0001$). Nos animais saudáveis, a prática de exercício físico (13 semanas) promoveu um aumento estatisticamente significativo de aproximadamente 4% da CSA do músculo ($1727 \pm 624 \mu\text{m}^2$ Cont+Ex vs. $1651 \pm 683 \mu\text{m}^2$ Cont+Sed; $p < 0,05$).

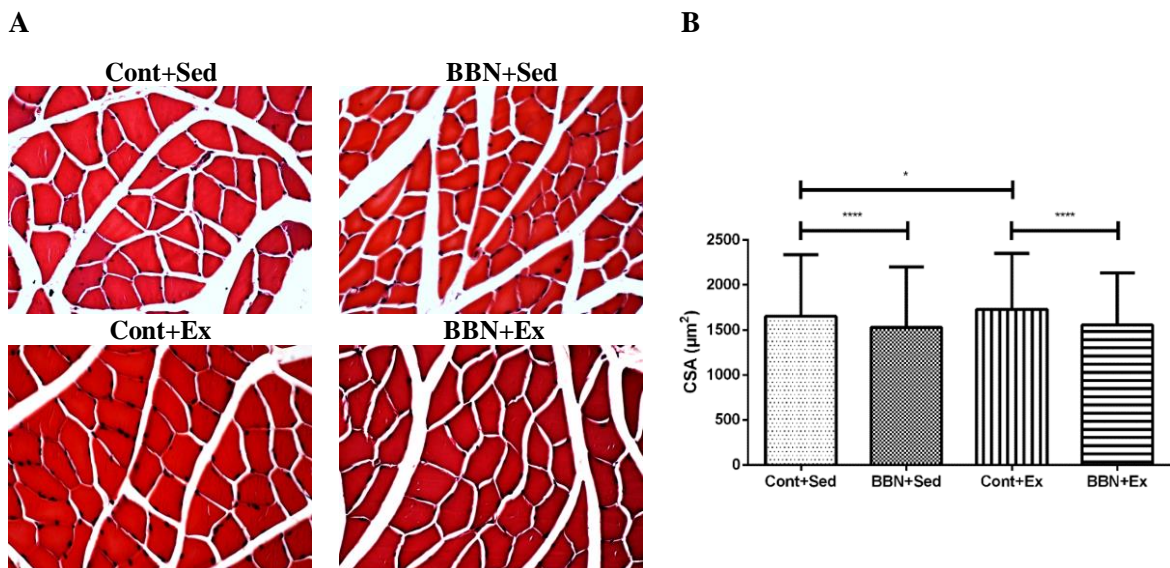


Figura 9: Efeito da exposição ao BBN e/ou à prática de exercício físico na área da secção transversal do músculo *gastrocnemius*. Em (A) as fotografias da avaliação histológica com a coloração de Hematoxilina-Eosina, fotografadas com a ampliação de 400x, e em (B) a quantificação da CSA para todos os grupos experimentais. Foram analisadas 988 ± 305 fibras por grupo. Os valores são expressos em média \pm desvio padrão (* $p < 0,05$; *** $p < 0,0001$).

Paralelamente também foi avaliada a fibrose intersticial no músculo *gastrocnemius* em resposta à exposição ao BBN e/ou à prática de exercício físico através da coloração de *Picrosirius Red*, que permite avaliar a distribuição das fibras de colagénio (coradas a vermelho) e das células musculares (coradas a amarelo). As fotografias foram analisadas recorrendo ao *software* Image-Pro Plus v6.0.0.260 (Media Cybernetics, Inc.). O nível de fibrose numa dada amostra foi determinado pelo rácio entre a percentagem de colagénio e a percentagem de miócitos (Figura 10). A análise dos dados obtidos revelou que a exposição ao BBN causou um aumento estatisticamente significativo da fibrose em 29% quando comparados com os animais sedentários ($0,1476 \pm 0,0426$ BBN+Sed vs. $0,1139 \pm 0,0495$ Cont+Sed; $p < 0,05$). O treino de exercício físico atenuou o aumento da fibrose induzida pela exposição ao BBN em 30% ($0,1021 \pm 0,0393$ BBN+Ex vs. $0,1476 \pm 0,0426$ BBN+Sed; $p < 0,001$).

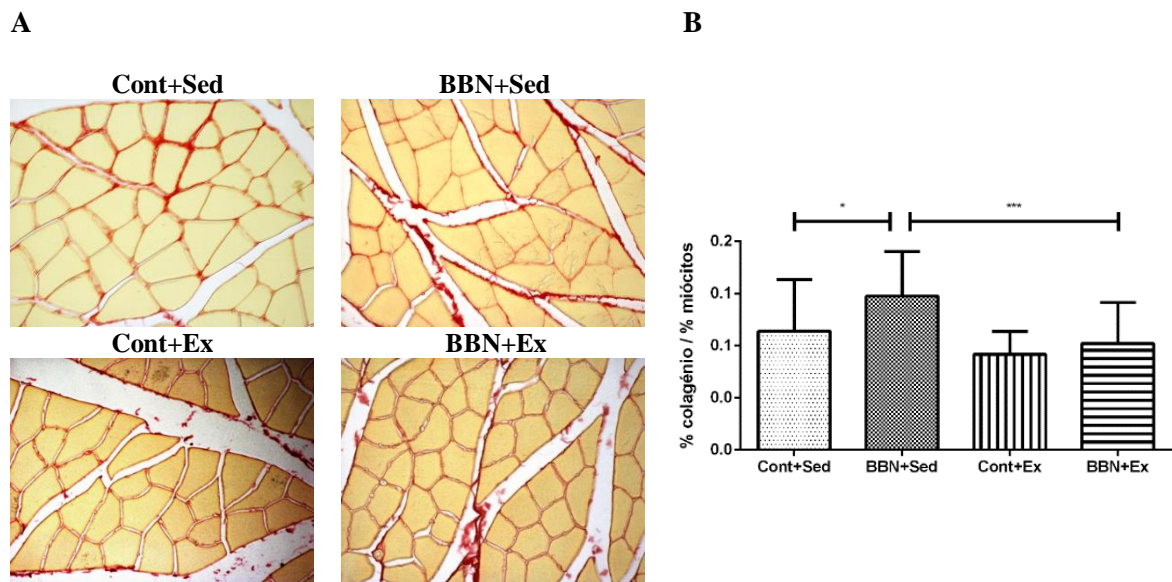


Figura 10: Efeito da exposição ao BBN e/ou à prática de exercício físico nos níveis de fibrose intersticial do músculo *gastrocnemius*. Em (A) fotografias da avaliação histológica com coloração de *Picrosirius Red*, fotografadas com a ampliação de 400x, e em (B) a quantificação da fibrose intersticial para todos os grupos experimentais. Os valores são expressos em média \pm desvio padrão (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$).

3. Remodelação metabólica do músculo *gastrocnemius* em resposta à exposição ao BBN e/ou à prática de ERTMLD

Com o objetivo de caracterizar o efeito da exposição ao BBN e/ou à prática de ERTMLD na remodelação metabólica do músculo *gastrocnemius*, determinou-se a expressão mitocondrial de ATP sintase subunidade β (ATPB), enzima da cadeia respiratória localizada na membrana interna mitocondrial, responsável pela síntese de ATP, nos extratos mitocondrial e no homogeneizado total. Além disso, os níveis de gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) muscular, uma enzima chave da glicólise, foram determinados por Western blotting. A exposição ao BBN causou uma diminuição estatisticamente significativa dos níveis de ATPB mitocondrial tanto nos animais sedentários como nos exercitados (Figura 11A, BBN+Sed vs. Cont+Sed; $p < 0,05$; BBN+Ex vs. Cont+Ex; $p < 0,01$). A quantificação espectral da atividade do complexo V (Figura 11B) revelou uma diminuição com a exposição ao BBN nos animais sedentários, embora sem significado estatístico. No entanto, a prática de exercício físico reverteu esta tendência, tendo sido observado um aumento estatisticamente significativo da atividade da ATP sintase nos animais BBN exercitados (BBN+Ex vs. BBN+Sed; $p < 0,01$). Relativamente aos níveis de ATPB (Figura 11C) e de GAPDH (Figura 11D) musculares, não se observaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais e consequentemente no rácio ATPB/GAPDH (Figura 11E), embora a prática de ERTMLD tenha sido responsável por um decréscimo do rácio no grupo saudável.

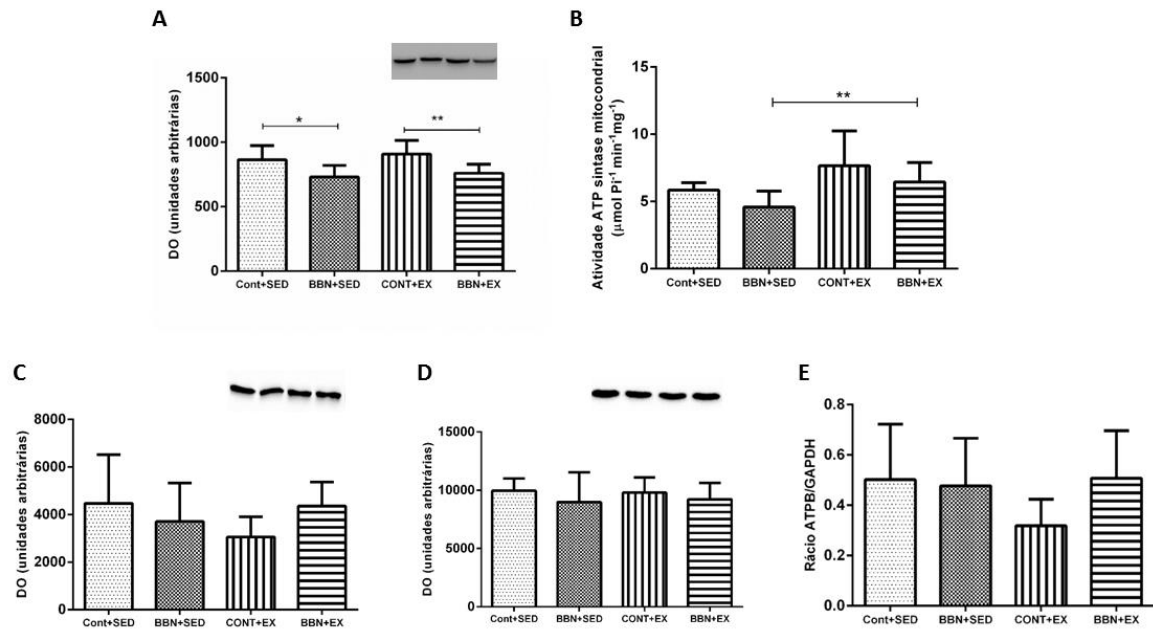


Figura 11: Efeito da exposição ao BBN e/ou à prática de ERTMLD na expressão mitocondrial da subunidade β da ATP sintase avaliada por Western blotting (A), atividade da ATP sintase na mitocôndria avaliada por espectofotometria (B), expressão da subunidade β da ATP sintase no músculo total (C) e expressão da GAPDH no músculo total (D) avaliadas por Western blotting e do rácio ATPB/GAPDH (E). Imagens representativas dos imunoblots são apresentadas acima dos respectivos gráficos. Os valores são expressos em média \pm desvio padrão (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

Paralelamente, analisaram-se subunidades do sistema de fosforilação oxidativa usando o kit *Mitoprofile® Total OXPHOS Cocktail* (Figura 12), tendo-se verificado que a exposição ao BBN causou uma diminuição nos níveis das subunidades dos complexos I e II (BBN+Sed vs. Cont+Sed, Figuras 12F e 12E, respetivamente) e não teve qualquer efeito nos níveis das outras subunidades dos complexos analisados. A prática de ERTMLD reverteu este efeito, promovendo um aumento dos níveis de NDUF88 (complexo I) e de SDH8 (complexo II) na mitocôndria do músculo *gastrocnemius* dos animais expostos ao BBN (BBN+Ex vs. BBN+Sed; $p < 0,01$ e BBN+Ex vs. BBN+Sed; $p < 0,05$, respetivamente). Os níveis das subunidades NDUF88 do complexo I e SDH8 do complexo II aumentaram aproximadamente 37,45% e 15,13%, respetivamente, nos animais BBN+Ex quando comparados com os animais BBN+Sed (Figuras 12F e 12E, respetivamente).

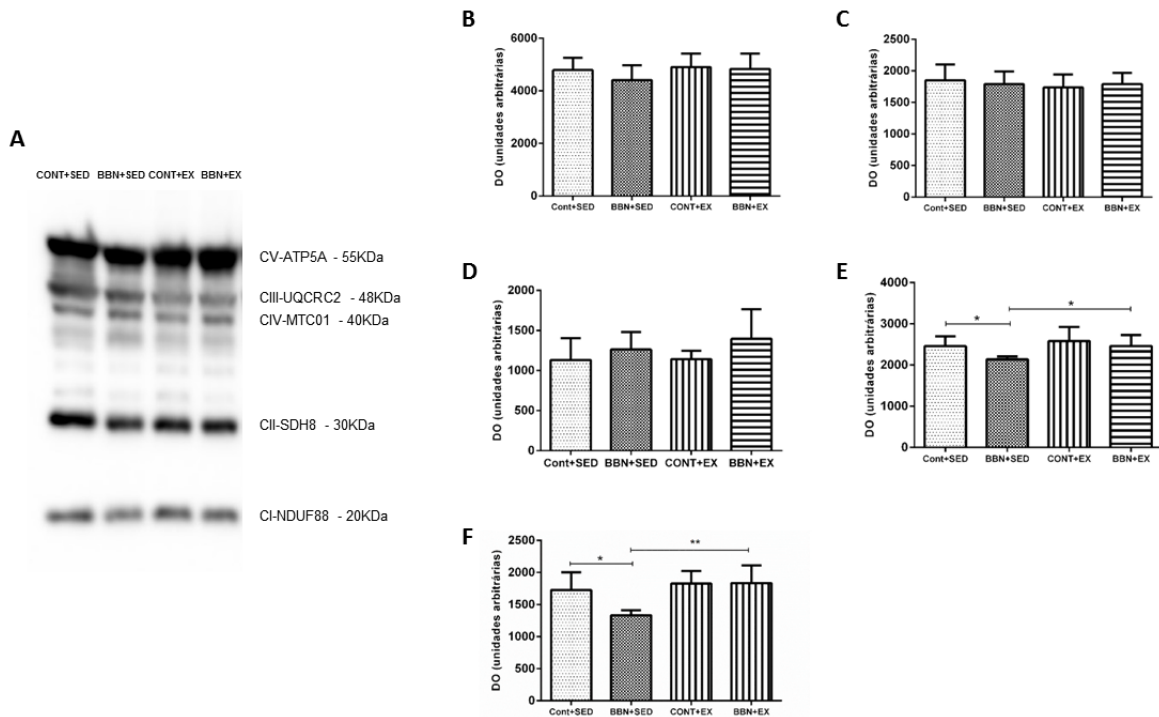


Figura 12: Efeito da exposição ao BBN e/ou à prática de ERTMLD na expressão das subunidades OXPHOS nas mitocôndrias do músculo *gastrocnemius* de todos os animais dos grupos experimentais. Em (A) encontra-se o perfil immunoblot representativo. A análise semi-quantitativa das subunidades OXPHOS complexo V, CV-ATP5A (B), complexo III, CIII-UQCRC2 (C), complexo IV, CIV-MTC01 (D), complexo II, CII-SDH8 (E) e complexo I, CI-NDUF88 (F). Os valores são expressos em média \pm desvio padrão (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

4. Impacto da exposição ao BBN e/ou à prática de ERTMLD na biogênese mitocondrial

O efeito da exposição ao BBN e/ou à prática de ERTMLD na biogênese mitocondrial foi avaliada através da expressão das proteínas PGC-1 α , no músculo *gastrocnemius*, e Tfam na mitocôndria por Western blotting. Como se pode constatar pela análise da Figura 13A, os níveis de PGC-1 α não foram modulados pela exposição ao BBN, apesar de se observar uma tendência para uma diminuição da sua expressão. No entanto, os níveis de PGC-1 α (Figura 13A) foram modulados pelo exercício físico tanto nos animais saudáveis como nos animais expostos ao BBN, tendo promovido um aumento estatisticamente significativo (Cont+Sed vs. Cont+Ex; $p < 0,05$; BBN+Sed vs. BBN+Ex; $p < 0,01$). Por sua vez, os níveis de Tfam (Figura 13B) foram modulados pela exposição ao BBN, tendo-se observado uma redução

estatisticamente significativa entre os animais sedentários (Cont+Sed vs. BBN+Sed; $p < 0,01$). A prática de ERTMLD reverteu este efeito, promovendo um aumento estatisticamente significativo (BBN+Ex vs. BBN+Sed; $p < 0,01$). Observou-se ainda que a prática de ERTMLD promoveu um aumento nos níveis da Sirt3, responsável pela regulação da desacetilação da PGC-1 α , nos animais Controlo (Cont+Sed vs. Cont+Ex; $p < 0,01$), e os seus níveis diminuíram significativamente aquando da exposição ao BBN nos animais exercitados (Cont+Ex vs. BBN+Ex; $p < 0,001$).

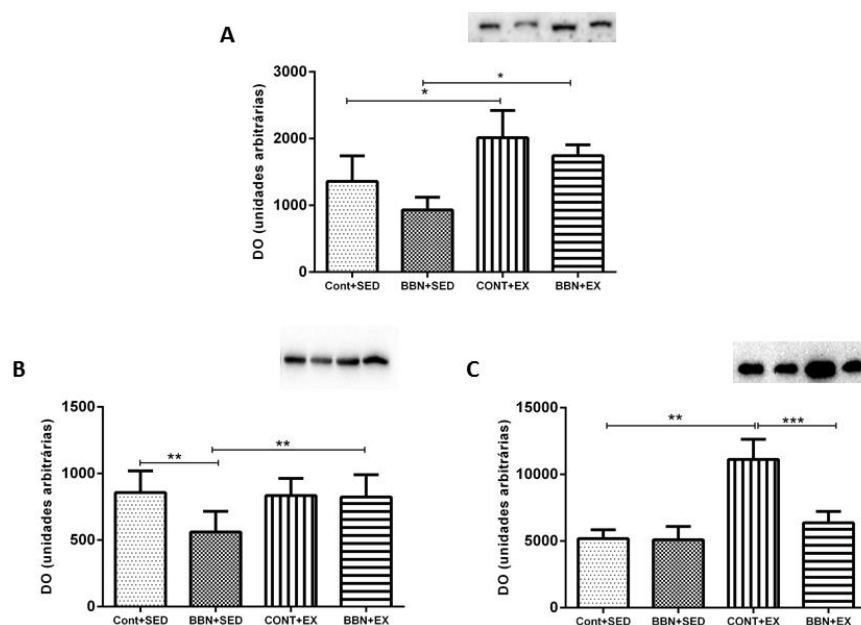


Figura 13: Efeito da exposição ao BBN e/ou à prática de ERTMLD nos níveis de PGC-1 α do músculo total (A), Tfam mitocondrial (B) e Sirt3 mitocondrial (C). Imagens representativas dos immunoblots são apresentados acima dos respetivos gráficos. Os valores são expressos em média \pm desvio padrão (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

5. Impacto da exposição ao BBN e/ou à prática de ERTMLD na (auto)mitofagia

De modo a estudar o efeito da exposição ao BBN e/ou à prática de ERTMLD na ativação da autofagia, avaliou-se a expressão muscular e mitocondrial de LC3B, proteína usada como marcador da formação de autofagossomas. Pela análise da Figura 14 podemos verificar que nem os níveis de LC3BI nem de LC3BII foram modulados pela exposição ao

BBN e/ou prática de exercício físico. Curiosamente, verificou-se uma diminuição significativa do rácio LC3BII/LC3BI no músculo (Figura 14B) promovido pela exposição ao BBN, nos animais sedentários (Cont+Sed vs. BBN+Sed; $p < 0,001$). Uma vez que a autofagia é também importante para remover organelos disfuncionais como mitocôndrias, avaliamos ainda a expressão de Bnip3 (Figura 14E). A proteína Bnip3 está envolvida na regulação da mitofagia. Os resultados obtidos não revelaram nenhuma alteração estatisticamente significativa nos níveis de Bnip3 nos animais do grupo BBN. No entanto, a prática de ERTMLD promoveu um aumento estatisticamente significativo nos níveis de Bnip3 nos animais saudáveis (Cont+Sed vs. Cont+Ex; $p < 0,01$). Observou-se ainda uma pequena tendência para um aumento dos níveis de Bnip3 nos animais BBN exercitados (BBN+Ex vs. BBN+Sed), embora sem significado estatístico.

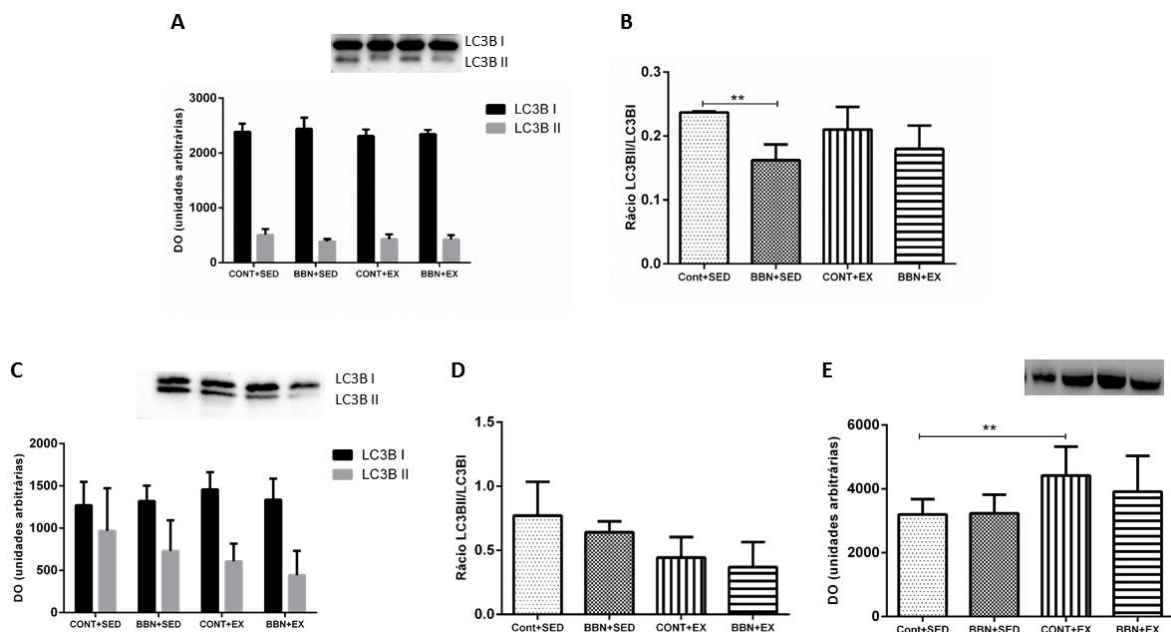


Figura 14: Efeito da exposição ao BBN e/ou à prática de ERTMLD nos níveis de LC3BI e LC3BII musculares (A), rácio LC3BII/LC3BI muscular (B), níveis de LC3BI e LC3BII mitocondriais (C), rácio LC3BII/LC3BI mitocondrial (D) e Bnip3 mitocondrial (E). Imagens representativas dos immunoblots são apresentados acima dos respetivos gráficos. Os valores são expressos em média \pm desvio padrão (** $p < 0,01$).

VI. Discussão

O carcinoma urotelial é uma das patologias mais prevalentes a nível mundial, ocupando o 11º lugar no tipo de cancro mais diagnosticado e constituindo o 14º tipo de cancro com maior número de óbitos associados, sendo mais incidente no sexo masculino (116). A suscetibilidade de desenvolver cancro urotelial depende de vários factores, sendo que o tabaco constitui um fator de risco elevado, tendo em conta que cerca de metade dos pacientes com carcinoma urotelial são fumadores (117). Apesar deste tipo de cancro não estar intimamente associado à caquexia, nos últimos anos tem-se verificado que a maioria dos pacientes com carcinoma urotelial em estadio avançado manifestam perda involuntária de peso corporal (38), estando associada a uma tolerância limitada aos tratamentos bem como a uma redução drástica da qualidade de vida e do tempo de sobrevivência (39). A caquexia associada ao cancro continua a ser um grande desafio clínico, sendo responsável por cerca de 30% dos óbitos associados (35). Vários tratamentos têm sido propostos, mas a natureza complexa e multifatorial da caquexia associada ao cancro dificulta o desenvolvimento de estratégias específicas e eficazes (8).

Entre as terapias não-farmacológicas, a prática de exercício físico tem vindo a ser sugerida como uma abordagem viável, com potenciais efeitos benéficos para o paciente oncológico que evidencia maior suscetibilidade de desenvolver caquexia (15). De forma a caracterizar bioquimicamente a caquexia associada ao carcinoma urotelial e avaliar qual o impacto da prática de exercício físico na modulação desta síndrome, foi implementado um protocolo animal de carcinoma urotelial induzido quimicamente pela exposição ao BBN, sendo os animais submetidos a 13 semanas de exercício físico. Este modelo animal reflete um dos tumores malignos mais comuns do trato urinário humano, associados a fatores de risco químico como o tabaco (118). O BBN é um composto genotóxico com elevada atividade carcinogénica que, quando administrado na água para consumo animal é capaz de induzir tumores uroteliais morfológicamente semelhantes aos que se verificam em humanos (111). Estudos recentes elegeram este modelo animal para caracterizar as alterações morfológicas e bioquímicas subjacentes à caquexia e para desvendarem novas estratégias terapêuticas (17,38).

Com a implementação deste modelo animal verificou-se que a exposição ao BBN induziu lesões uroteliais dentro de 20 semanas de exposição ao carcinogénico. Os animais

expostos ao BBN evidenciaram um decréscimo de peso corporal de 9% quando comparados com os animais saudáveis (Tabela 1), sugestivo de catabolismo muscular esquelético. Estes resultados suportam a presença de caquexia associada ao cancro (perda de peso corporal igual ou superior a 5% num período inferior a um ano), um valor que em humanos é visto como um sinal de caquexia ligeira a moderada de acordo com a CASCO (30). A prática de ERTMLD promoveu um aumento no rácio massa de *gastrocnemius*/peso corporal, sugerindo alterações nas propriedades musculares.

A caquexia associada ao cancro está associada a uma inflamação sistémica generalizada, responsável pela indução da proteólise e lipólise, conduzindo à perda de massa muscular e tecido adiposo e, portanto, peso corporal (2,8,97). No presente estudo, uma diminuição tendencial da concentração de albumina nos animais do grupo BBN (Tabela 2) parece apoiar a presença de um perfil inflamatório e o desencadeamento de uma resposta hepática de fase aguda, apoiada por vários estudos (4,49,55). A albumina desempenha um papel fundamental na manutenção da pressão osmótica e prevenção de edema. Níveis reduzidos de albumina são consistentemente descritos em quase todas as condições catabólicas, incluindo caquexia (119–121). A presença de uma resposta hepática de fase aguda caracteriza-se por uma diminuição na produção de albumina em favor de proteínas de fase aguda, tais como a PCR e fibrinogénio, originando uma desregulação nas vias de síntese/degradação proteicas (97). A hiperlipidemia subjacente à caquexia surge de uma redução na atividade da lipoproteína lipase (LPL), diminuindo a capacidade dos adipócitos em extrair triglicéridos da corrente sanguínea (122). Contudo, os dados obtidos no presente estudo não apoiam o quadro de hiperlipidemia habitualmente descrito na caquexia associada ao cancro (97), uma vez que os níveis de TG não se alteram com a exposição ao BBN (Tabela 2). No entanto, o fenótipo catabólico presente na caquexia associada ao carcinoma urotelial nem sempre é acompanhado por alterações significativas na lipólise (123). A diminuição dos níveis séricos de ALP e ASAT nos animais expostos ao BBN também foi observada. Tem sido sugerido que níveis elevados de ALP estão associados a uma diminuição da sobrevivência dos pacientes oncológicos (124,125). A hipercolesterolemia é frequentemente detetada em cancro, possivelmente devido a uma desregulação no controlo por *feedback* da enzima-chave da síntese de colesterol, a HMG-CoA reductase (126). Apesar disso verificou-se uma diminuição tendencial dos níveis de colesterol quando comparado com os animais saudáveis, como descrito num estudo recente onde foi estudado o mesmo modelo animal (38).

A perda de peso corporal observada nos animais BBN foi acompanhada por alterações morfológicas no músculo *gastrocnemius* (Figuras 9 e 10). Nos animais expostos ao BBN verificou-se uma redução da CSA das fibras (Figura 9), bem como um aumento da fibrose muscular (Figura 10), sugestivos de disfunção muscular subjacente à caquexia associada ao cancro, caracterizada por fraqueza e fadiga musculares (30,78). Estes dados corroboram os resultados descritos em estudos anteriores (17,29,38,49,127). Ao contrário do esperado, a prática de exercício físico não foi capaz de reverter a redução da CSA das fibras nos animais BBN, ao contrário do descrito num estudo anterior (29). No entanto, nos animais saudáveis observou-se um aumento da CSA das fibras (Figura 9) promovido pela prática de exercício físico. Este aumento da CSA induzido pela prática de exercício físico está em concordância com estudos anteriores (27,29,49), que relacionam a hipertrofia observada com um aumento da sinalização da via de síntese proteica Akt-mTOR. Por outro lado, a prática de exercício físico foi capaz de atenuar a fibrose muscular (Figura 10) induzida pela exposição ao BBN, à semelhança do descrito noutro estudo (27). Estes dados são indicativos do efeito anti-inflamatório do exercício físico que parece estar intimamente relacionado com a inibição de citocinas pro-inflamatórias tais como TWEAK (27). TWEAK é uma citocina que parece induzir atrofia muscular, disfunção contráctil e fibrose intersticial, atuando através da via NF- κ B (64). A prática de exercício físico parece atenuar os níveis desta citocina, contribuindo não só para uma menor percentagem de fibrose como também uma reposição da CSA (27,128).

As alterações morfológicas observadas no músculo *gastrocnemius* foram também acompanhadas por alterações na plasticidade mitocondrial, um organelo regulador do *turnover* proteico muscular (15,129). A mitocôndria parece ser responsável pelo desequilíbrio energético em situações de elevada proteólise muscular, como se verifica na caquexia associada ao cancro (2,8,10,12). No entanto, os mecanismos moleculares localizados na mitocôndria não têm sido amplamente estudados. Os dados obtidos são indicativos de uma diminuição na capacidade de produção de ATP no músculo *gastrocnemius* de animais expostos ao BBN, tendo em conta a redução nos níveis de ATPB mitocondrial (Figura 11A), assim como uma diminuição (embora não significativa) da atividade da ATP sintase no grupo animal sedentário (Figura 11B). Estas alterações funcionais foram previamente relacionadas com alterações na morfologia mitocondrial, nomeadamente o *swelling*, que parece ser indicativo de um comprometimento na

fosforilação oxidativa e síntese de ATP (78). Em linha com os dados obtidos, estudos anteriores também relacionaram a exposição ao BBN com uma redução nos níveis de ATPB mitocondrial (17,38). A prática de ERTMLD durante 13 semanas não provocou alterações significativas nos níveis de ATPB (Figura 11C) nem nos níveis de GAPDH (Figura 11D) musculares em animais expostos ao BBN. Esta observação surge em contraste com o descrito recentemente num modelo animal de cancro da mama submetido a exercício em tapete durante 35 semanas, onde se observou um aumento dos níveis de ATPB nos animais exercitados, conduzindo a um aumento do rácio ATPB/GAPDH nestes grupos (29). Paralelamente, apesar de se ter verificado uma redução da expressão de subunidades dos complexos do sistema de fosforilação oxidativa mitocondrial subjacente à caquexia associada ao cancro, o que está de acordo com estudos anteriores (15,23,29,72,119), só a expressão das subunidades NDUF88 do complexo I e SDH8 do complexo II da OXPHOS (Figuras 12F e 12E, respetivamente) apresentaram uma redução significativa nos animais expostos ao BBN. Estes resultados apoiam a perda de capacidade oxidativa verificada em quadros clínicos de caquexia associada ao cancro (9,12,40). A prática de ERTMLD promoveu o aumento da expressão das subunidades NDUF88 do complexo I (Figura 12F) e SDH8 do complexo II (Figura 12E), assim como o aumento da atividade da ATP sintase (Figura 11B) entre animais expostos ao BBN que praticaram exercício, indicando um aumento da capacidade oxidativa.

O fenótipo do músculo esquelético subjacente à caquexia associada ao cancro é caracterizado pela diminuição do número de mitocôndrias (8,73) e pela redução da expressão de fatores reguladores envolvidos na biogénese mitocondrial (15,23). A biogénese mitocondrial é controlada pela PGC-1 α , funcionando como co-ativadora de um número de fatores de transcrição responsáveis pela coordenação dos processos de replicação do mtDNA (entre os quais Tfam) e indução das vias de síntese proteicas (130). A exposição ao BBN teve impacto na biogénese mitocondrial, evidenciado pela diminuição dos níveis de PGC-1 α , embora não significativa, bem como um decréscimo nos níveis de Tfam entre os animais sedentários. Níveis reduzidos de PGC-1 α subjacentes à caquexia têm sido descritos na literatura, tanto em músculos oxidativos (*soleus*), como em músculos mistos (*gastrocnemius*) (15,23). Modelos animais *PGC-1 α knockout* exibem conteúdo mitocondrial reduzido, disfunção ao nível do sistema de controlo de qualidade mitocondrial e um aumento de suscetibilidade à apoptose (131). Os nossos dados corroboram os resultados de outros

estudos (38,41) em que a expressão de Tfam se encontra diminuída no músculo *gastrocnemius* de animais caquéticos. Devido ao seu envolvimento na manutenção do DNA (8), a redução dos níveis de Tfam sugere um comprometimento da transcrição mitocondrial, uma etapa fulcral na biogénese mitocondrial (132). Os nossos resultados evidenciaram também que 13 semanas de exercício físico modularam os marcadores de biogénese mitocondrial, nomeadamente a PGC-1 α que aumentou nos animais saudáveis e nos animais com cancro (Figura 13A) e Tfam, que registou um aumento significativo nos animais com cancro (Figura 13B). A prática de apenas 4 semanas de corrida em tapete rolante parece ser suficiente para induzir o aumento dos níveis de PGC-1 α no músculo esquelético (133). Um estudo recente verificou que a indução de caquexia através da sobre-expressão de IL-6 em modelos de ratos Apc^{+/-} foi suficiente para induzir a expressão de PGC-1 α após 12 semanas de treino moderado (15). O treino de exercício em tapete rolante tem sido capaz de induzir a expressão de PGC-1 α em condições de perda de massa muscular (29,41). Apesar dos mecanismos pelos quais a exposição ao BBN e/ou a prática de exercício físico coordenam estes eventos de controlo de qualidade no músculo esquelético permanecerem pouco claros, várias hipóteses sugerem que podem estar relacionados com alterações no conteúdo e/ou atividade de proteínas que são essenciais no controlo de modificações pós-traducionais de outras proteínas, através de (des)fosforilações, (de)metilações e (des)acetilações. Um exemplo é a Sirt3, uma desacetilase mitocondrial envolvida no controlo de múltiplos processos metabólicos, nomeadamente na modulação da PGC-1 α , desacetilando-a em múltiplos resíduos de lisina e ativando-a (85), que se encontra aumentada com a prática de exercício físico (Figura 13C). A redução dos níveis de Sirt3 que se verificaram com a exposição ao BBN em animais exercitados parecem ser responsáveis, pelo menos em parte, pelo decréscimo paralelo que se verificou na expressão de PGC-1 α (Figura 13A). Consequentemente, Samant *et al.* (134) referiu que a Sirt3 promove a função mitocondrial não só por regular a atividade de enzimas metabólicas mas também por regular a dinâmica mitocondrial.

O presente estudo teve também como objetivo verificar se a (auto)mitofagia é modulada no músculo *gastrocnemius* de animais expostos ao BBN e/ou à prática de exercício físico. Alguns dados suportam a hipótese de que a autofagia está associada à perda de massa muscular esquelética em vários modelos de caquexia associada ao cancro (95,135,136). Neste estudo avaliamos a expressão de LC3B, marcador amplamente usado

para avaliar a formação de autofagossomas. Avaliamos ainda a expressão das isoformas LC3BI, que reside no citosol, e a LC3BII, que está intimamente ligada à membrana do autofagossoma e resulta da conjugação de LC3BI com PE (95). Curiosamente, os nossos resultados evidenciaram que a expressão de LC3BI e LC3BII não é modulada pela exposição ao carcinogénico e/ou exercício físico (Figura 14). Estes resultados claramente diferem dos encontrados por Aversa *et al.* (95) que demonstram um aumento nos níveis de LC3BII em biópsias do músculo abdominal de pacientes com caquexia associada ao cancro, enquanto que os níveis de LC3BI permanecem inalterados. A quantificação da LC3BII é normalmente utilizada para estimar a abundância de autofagossomas. A conversão de LC3BI em LC3BII impulsiona a ativação da autofagia e um rácio LC3BII/LC3BI elevado pode ser sugestivo de um aumento no número de autofagossomas ou comprometimento do *turnover* dos mesmos (137). Os nossos resultados evidenciaram uma diminuição do rácio LC3BII/LC3BI no músculo total de animais sedentários expostos ao BBN (Figura 14B), o que poderá indicar um comprometimento ao nível da autofagia. Estes resultados não corroboram com os dados de outro grupo de investigação (28) que demonstraram um aumento no rácio LC3BII/LC3BI em modelos animais de carcinoma do cólon (C26). O protocolo de exercício físico terapêutico não modulou os níveis de LC3B, ao contrário do observado num outro estudo por White *et al.* (15) em que a indução de caquexia através da sobre-expressão de IL-6 em modelos de ratos *Apc^{+/-}* foi suficiente para aumentar a expressão de LC3B, tendo esta diminuído em 28% após 12 semanas de treino moderado.

A mitofagia é uma forma seletiva de autofagia que desempenha um papel importante na remoção de mitocôndrias disfuncionais e regula o *turnover* e a abundância mitocondrial de acordo com as necessidades metabólicas (91,138). O comprometimento da mitofagia é nefasto para a homeostasia do músculo esquelético e resulta na acumulação de mitocôndrias disfuncionais (41). Assim, avaliámos a expressão de Bnip3, uma proteína envolvida na regulação da mitofagia (41,138). Os resultados obtidos não revelaram diferenças estatisticamente significativas na expressão de Bnip3 nos animais expostos ao BBN (Figura 14E), apesar de se observar uma tendência para aumentar nos animais caquéticos que efetuaram exercício físico. A prática de ERTMLD promoveu um aumento da expressão de Bnip3 nos animais saudáveis, evidenciando um aumento da mitofagia, tal como sugerido em estudos anteriores (133,137). A Bnip3 parece interagir com a LC3BII, sendo modulada pela fosforilação de resíduos de serina/treonina, e está associada a processos de mitofagia, através

do efeito disruptor que parece exercer no potencial das membranas mitocondriais (11). De forma a melhor integrar os resultados obtidos neste trabalho, na Figura 15 encontram-se representadas as principais alterações no músculo *gastrocnemius* e mitocôndria promovidos pela exposição ao BBN e/ou à prática de exercício físico terapêutico.

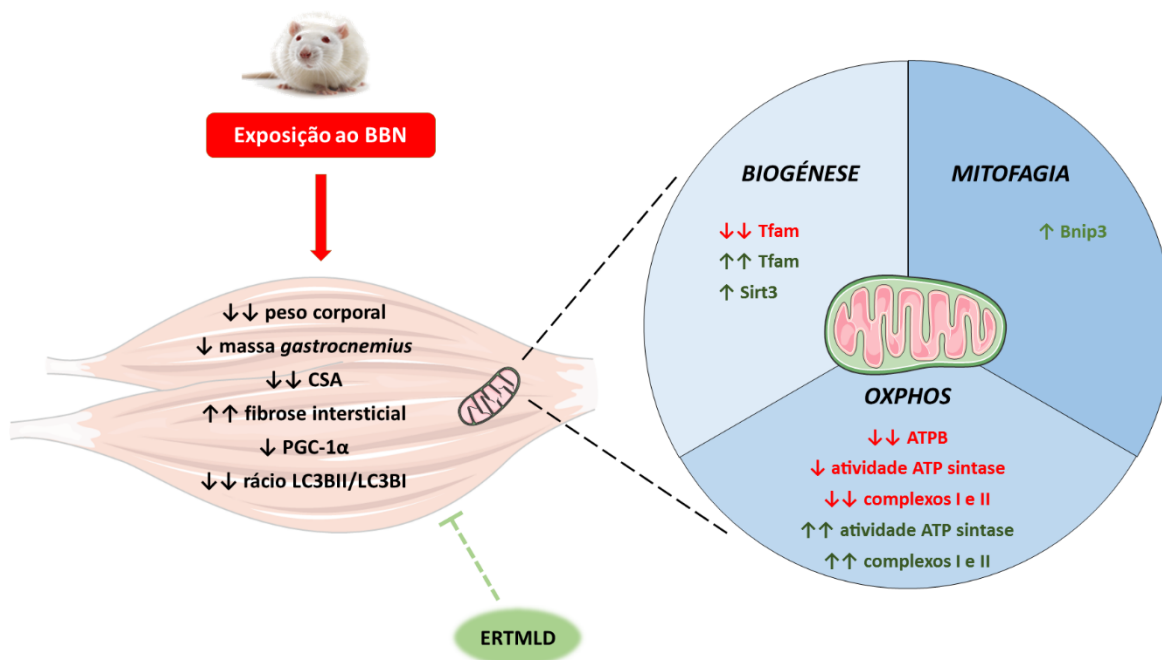


Figura 15: Visão geral dos resultados obtidos no estudo presente, promovidos pela exposição animal ao BBN e/ou à prática de exercício físico terapêutico. Duas setas (↑↑) indicam que ocorreu uma variação estatisticamente significativa em determinado parâmetro. Uma seta (↑) indica que ocorreu variação sem significado estatístico. A vermelho encontram-se os parâmetros alterados com a exposição ao BBN e a verde os parâmetros afetados pela prática de ERTMLD.

Figura elaborada com base no *Servier Medical Art* (<http://www.servier.com/Powerpoint-image-bank>).

VII. Conclusão

No sentido de avaliar a influência do carcinoma urotelial e/ou da prática de exercício físico terapêutico na plasticidade mitocondrial subjacente à caquexia associada ao cancro, foi implementado um protocolo animal de carcinoma urotelial induzido quimicamente, posteriormente submetido a 13 semanas de ERTMLD. Os resultados obtidos permitem concluir:

- i. A exposição ao agente carcinogénico BBN provocou uma perda de peso corporal acentuada, sugerindo a presença de caquexia neste modelo animal. O protocolo de exercício implementado não foi capaz de contrariar significativamente esta perda de peso.
- ii. A indução do carcinoma urotelial promoveu uma diminuição da CSA do músculo *gastrocnemius* e aumento de fibrose muscular, que foram atenuadas com 13 semanas de ERTMLD.
- iii. O carcinoma urotelial promoveu um comprometimento mitocondrial no músculo *gastrocnemius*, manifestado por uma diminuição da expressão de ATPB e das subunidades NDUF88 e SDH8 da OXPHOS, bem como uma redução da atividade da ATP sintase, paralelamente a uma diminuição da biogénese mitocondrial (PGC-1 α , Tfam), sem impacto aparente na (auto)mitofagia. A prática de ERTMLD atenuou a redução da ATP sintase, a diminuição dos níveis das subunidades dos complexos I e II da OXPHOS, promovendo o aumento dos marcadores de biogénese mitocondrial (PGC-1 α , Tfam e Sirt3) e mitofagia (Bnip3).

Assim, os resultados obtidos no presente estudo sugerem que a caquexia associada ao carcinoma urotelial está relacionada com a disfunção do músculo *gastrocnemius*, dado pelas alterações morfológicas do músculo esquelético, bem como por uma remodelação ao nível mitocondrial, caracterizada por uma diminuição da funcionalidade e da biogénese mitocondrial. Dos nossos resultados ressaltam o efeito benéfico do exercício físico na

reversão da disfunção muscular esquelética subjacente à caquexia associada ao carcinoma urotelial por atenuar a fibrose muscular e a redução da CSA, bem como por aumentar a biogénese mitocondrial.

As evidências moleculares obtidas no presente estudo suportam a recomendação da prática de exercício físico a pacientes oncológicos, com vista a reverter a caquexia associada ao cancro. Estudos futuros serão importantes para alargar o conhecimento dos mecanismos moleculares modulados pela caquexia associada ao cancro e por diferentes programas de exercício físico, com diferentes intensidades e duração.

VIII. Referências bibliográficas

1. von Haehling S, Anker SD. Prevalence, incidence and clinical impact of cachexia: facts and numbers-update 2014. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2014;5(4):261–3.
2. Argilés JM, Busquets S, Stemmler B, López-Soriano FJ. Cancer cachexia: understanding the molecular basis. *Nat Rev Cancer*. 2014;14(11):754–62.
3. Argilés JM, Fontes-Oliveira CC, Toledo M, López-Soriano FJ, Busquets S. Cachexia: a problem of energetic inefficiency. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2014;5(4):279–86.
4. Tisdale MJ. Cancer cachexia. *Langenbecks Arch Surg*. 2004;389:299–305.
5. Han HQ, Zhou X, Mitch WE, Goldberg AL. Myostatin/activin pathway antagonism: Molecular basis and therapeutic potential. *Int J Biochem Cell Biol*. 2013;45(10):2333–47.
6. Acharyya S, Ladner KJ, Nelsen LL, Damrauer J, Reiser PJ, Swoap S, Guttridge DC. Cancer cachexia is regulated by selective targeting of skeletal muscle gene products. *J Clin Invest*. 2004;114(3):370–8.
7. Fearon KCH. Cancer cachexia: Developing multimodal therapy for a multidimensional problem. *Eur J Cancer*. 2008;44(8):1124–32.
8. Carson JA, Hardee JP, VanderVeen BN. The emerging role of skeletal muscle oxidative metabolism as a biological target and cellular regulator of cancer-induced muscle wasting. *Semin Cell Dev Biol*. Elsevier Ltd; 2015;1–15.
9. Onesti JK, Guttridge DC. Inflammation based regulation of cancer cachexia. *Biomed Res Int*. 2014;2014:168407.
10. Julienne CM, Dumas J-F, Goupille C, Pinault M, Berri C, Collin A, Tesseraud S, Couet C, Servais S. Cancer cachexia is associated with a decrease in skeletal muscle mitochondrial oxidative capacities without alteration of ATP production efficiency. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2012;3(4):265–75.
11. Vitorino R, Moreira-Gonçalves D, Ferreira R. Mitochondrial plasticity in cancer-related muscle wasting. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2015;18(3):226–33.
12. Argilés JM, López-Soriano FJ, Busquets S. Muscle wasting in cancer: the role of mitochondria. *Curr Opin*. 2015;18:221–5.
13. Bonaldo P, Sandri M. Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy. *Dis Model Mech*. 2013;6(1):25–39.
14. Bassel-Duby R, Olson EN. Signaling Pathways in Skeletal Muscle Remodeling. *Annu Rev Biochem*. 2006;75(1):19–37.
15. White JP, Puppa MJ, Sato S, Gao S, Price RL, Baynes JW, Kostek MC, Matesic LE, Carson J a. IL-6 regulation on skeletal muscle mitochondrial remodeling during cancer cachexia in

- the *ApcMin/+* mouse. *Skelet Muscle*. 2012;2(1):14.
16. Fischer F, Hamann A, Osiewacz HD. Mitochondrial quality control: an integrated network of pathways. *Trends Biochem Sci*. Elsevier Ltd; 2012;37(7):284–92.
 17. Antunes D, Padrão AI, Maciel E, Santinha D, Oliveira P, Vitorino R, Moreira-Gonçalves D, Colaço B, Pires MJ, Nunes C, Santos LL, Amado F, Duarte JA, Domingues MR, Ferreira R. Molecular insights into mitochondrial dysfunction in cancer-related muscle wasting. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1841(6):896–905.
 18. Menshikova E V., Ritov VB, Fairfull L, Ferrell RE, Kelley DE, Goodpaster BH. Effects of Exercise on Mitochondrial Content and Function in Aging Human Skeletal Muscle. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2006;61(6):534–40.
 19. Quist M, Rorth M, Zacho M, Andersen C, Moeller T, Midtgaard J, Adamsen L. High-intensity resistance and cardiovascular training improve physical capacity in cancer patients undergoing chemotherapy. *Scand J Med Sci Sports*. 2006;16(5):349–57.
 20. Lenk K, Schuler G, Adams V. Skeletal muscle wasting in cachexia and sarcopenia: molecular pathophysiology and impact of exercise training. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2010;1(1):9–21.
 21. Yan Z, Lira VA, Greene NP. Exercise training-induced regulation of mitochondrial quality. *Exerc Sport Sci Rev*. 2012;40(3):159–64.
 22. Gould DW, Lahart I, Carmichael AR, Koutedakis Y, Metsios GS. Cancer cachexia prevention via physical exercise: molecular mechanisms. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2013;4(2):111–24.
 23. White JP, Baltgalvis K a, Puppa MJ, Sato S, Baynes JW, Carson J a. Muscle oxidative capacity during IL-6-dependent cancer cachexia. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2011;300(5):R201–11.
 24. Sandri M, Lin J, Handschin C, Yang W, Arany ZP, Lecker SH, Goldberg AL, Spiegelman BM. PGC-1 α protects skeletal muscle from atrophy by suppressing FoxO3 action and atrophy-specific gene transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(44):16260–5.
 25. Ding H, Jiang N, Liu H, Liu X, Liu D, Zhao F, Wen L, Liu S, Ji LL, Zhang Y. Response of mitochondrial fusion and fission protein gene expression to exercise in rat skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj*. Elsevier B.V.; 2010;1800(3):250–6.
 26. Bowen TS, Schuler G, Adams V. Skeletal muscle wasting in cachexia and sarcopenia: molecular pathophysiology and impact of exercise training. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2015;6(3):197–207.
 27. Padrão AI, Moreira-Gonçalves D, Oliveira PA, Teixeira C, Faustino-Rocha AI, Helguero L, Vitorino R, Santos LL, Amado F, Duarte JA, Ferreira R. Endurance training prevents

- TWEAK but not myostatin-mediated cardiac remodelling in cancer cachexia. *Arch Biochem Biophys.* 2015;567:13–21.
28. Pigna E, Berardi E, Aulino P, Rizzuto E, Zampieri S, Carraro U, Kern H, Merigliano S, Gruppo M, Mericskay M, Li Z, Rocchi M, Barone R, Macaluso F, Di Felice V, Adamo S, Coletti D, Moresi V. Aerobic Exercise and Pharmacological Treatments Counteract Cachexia by Modulating Autophagy in Colon Cancer. *Sci Rep. Nature Publishing Group;* 2016;6(October 2015):26991.
 29. Padrão AI, Figueira ACC, Rocha-Faustino A, Gama A, Loureiro MM, Neuparth MJ, Moreira-Gonçalves D, Vitorino R, Amado F, Santos LL, Oliveira PA, Duarte JA, Ferreira R. Long-term exercise training prevents mammary tumorigenesis-induced muscle wasting in rats through the regulation of TWEAK signalling. *Acta Physiol.* 2016;
 30. Argilés JM, Lopez-Soriano FJ, Toledo M, Betancourt A, Serpe R, Busquets S, Argilés JM, López-Soriano FJ. The cachexia score (CASCO): a new tool for staging cachectic cancer patients. *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* 2011;2(2):87–93.
 31. Skipworth RJE, Stewart GD, Dejong CHC, Preston T, Fearon KCH. Pathophysiology of cancer cachexia: Much more than host–tumour interaction? *Clin Nutr.* 2007;26(6):667–76.
 32. Watanabe T, Shibata M, Nishiyama H, Soeda S, Furukawa S, Gonda K, Takenoshita S, Fujimori K. Serum levels of rapid turnover proteins are decreased and related to systemic inflammation in patients with ovarian cancer. *Oncol Lett.* 2014;7:373–7.
 33. Mendes MCS, Pimentel GD, Costa FO, Carvalheira JBC. Molecular and neuroendocrine mechanisms of cancer cachexia. *J Endocrinol.* 2015;226(3):R29–43.
 34. Aapro M, Arends J, Bozzetti F, Fearon K, Grunberg SM, Herrstedt J, Hopkinson J, Jacquelin-Ravel N, Jatoi A, Kaasa S, Strasser F. Early recognition of malnutrition and cachexia in the cancer patient: a position paper of a European School of Oncology Task Force. *Ann Oncol.* 2014;25(8):1492–9.
 35. von Haehling S, Anker SD. Cachexia as a major underestimated and unmet medical need: facts and numbers. *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* 2010;1(1):1–5.
 36. Lees J. Incidence of weight loss in head and neck cancer patients on commencing radiotherapy treatment at a regional oncology centre. *Eur J Cancer Care (Engl).* 1999;8(3):133–6.
 37. Kumar S, Kishimoto H, Chua HL, Badve S, Miller KD, Bigsby RM, Nakshatri H. Interleukin-1 alpha promotes tumor growth and cachexia in MCF-7 xenograft model of breast cancer. *Am J Pathol.* 2003;163(6):2531–41.
 38. 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. *Int J Biochem Cell Biol.* 2013;45(7):1399–409.
39. Fearon K, Strasser F, Anker SD, Bosaeus I, Bruera E, Fainsinger RL, Jatoi A, Loprinzi C, MacDonald N, Mantovani G, Davis M, Muscaritoli M, Ottery F, Radbruch L, Ravasco P, Walsh D, Wilcock A, Kaasa S, Baracos VE. Definition and classification of cancer cachexia: An international consensus. *Lancet Oncol.* 2011;12(5):489–95.
 40. Tisdale MJ. Cachexia in cancer patients. *Nat Rev Cancer.* 2002;2:862–71.
 41. Romanello V, Sandri M. Mitochondrial biogenesis and fragmentation as regulators of protein degradation in striated muscles. *J Mol Cell Cardiol.* Elsevier Ltd; 2013;55:64–72.
 42. Glass DJ. Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005;37(10):1974–84.
 43. Schiaffino S, Reggiani C. Fiber Types in Mammalian Skeletal Muscles. *Physiol Rev.* 2011;91(4):1447–531.
 44. Eng CM, Smallwood LH, Rainiero MP, Lahey M, Ward SR, Lieber RL. Scaling of muscle architecture and fiber types in the rat hindlimb. *J Exp Biol.* 2008;211(Pt 14):2336–45.
 45. Al-Majid S, McCarthy DO. Cancer-Induced Fatigue and Skeletal Muscle Wasting: The Role of Exercise. *Biol Res Nurs.* 2001;2(3):186–97.
 46. Cornachione AS, Benedini-Elias PC, Polizello JC, Carvalho LC, Mattiello-Sverzut AC. Characterization of fiber types in different muscles of the hindlimb in female weanling and adult Wistar rats. *Acta Histochem Cytochem.* 2011;44(2):43–50.
 47. Aulino P, Berardi E, Cardillo VM, Rizzuto E, Perniconi B, Ramina C, Padula F, Spugnini EP, Baldi A, Faiola F, Adamo S, Coletti D. Molecular, cellular and physiological characterization of the cancer cachexia-inducing C26 colon carcinoma in mouse. *BMC Cancer.* 2010;10:363.
 48. Wang Y, Pessin JE. Mechanisms for fiber-type specificity of skeletal muscle atrophy. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2013;16(3):243–50.
 49. Johns N, Stephens NA, Fearon KCH. Muscle wasting in cancer. *Int J Biochem Cell Biol.* 2013;45(10):2215–29.
 50. Williams A, Sun X, Fischer JE, Hasselgren P-OO. The expression of genes in the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway is increased in skeletal muscle from patients with cancer. *Surgery.* 1999;126(4):744-9-50.
 51. Cohen S, Brault JJ, Gygi SP, Glass DJ, Valenzuela DM, Gartner C, Latres E, Goldberg AL. During muscle atrophy, thick, but not thin, filament components are degraded by MuRF1-dependent ubiquitylation. *J Cell Biol.* 2009;185(6):1083–95.
 52. Rodriguez J, Vernus B, Chelh I, Cassar-Malek I, Gabillard JC, Hadj Sassi a., Seiliez I, Picard

- B, Bonniou a. Myostatin and the skeletal muscle atrophy and hypertrophy signaling pathways. *Cell Mol Life Sci.* 2014;4361–71.
53. Johns N, Hatakeyama S, Stephens NA, Degen M, Degen S, Friauff W, Lambert C, Ross JA, Roubenoff R, Glass DJ, Jacobi C, Fearon KCH. Clinical Classification of Cancer Cachexia: Phenotypic Correlates in Human Skeletal Muscle. *PLoS One.* 2014;9(1):e83618.
 54. Egerman MA, Glass DJ. Signaling pathways controlling skeletal muscle mass. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2014;49(1):59–68.
 55. Fearon KCH, Glass DJ, Guttridge DC. Cancer Cachexia: Mediators, Signaling, and Metabolic Pathways. *Cell Metab.* 2012;16(2):153–66.
 56. Argilés JM, Busquets S, López-Soriano FJ. The pivotal role of cytokines in muscle wasting during cancer. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005;37(10):2036–46.
 57. Carson J, Baltgalvis K. Interleukin-6 as a key regulator of muscle mass during cachexia. *Exerc Sport Sci Rev.* 2010;38(4):168–76.
 58. Steensberg A, Keller C, Starkie RL, Osada T, Febbraio M a, Pedersen BK. IL-6 and TNF- α expression in, and release from, contracting human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2002;283(6):E1272–8.
 59. Iwase S, Murakami T, Saito Y, Nakagawa K. Steep elevation of blood interleukin-6 (IL-6) associated only with late stages of cachexia in cancer patients. *Eur Cytokine Netw.* 2004;15(4):312–6.
 60. Zaki MH, Nemeth J a., Trikha M. CNTO 328, a monoclonal antibody to IL-6, inhibits human tumor-induced cachexia in nude mice. *Int J Cancer.* 2004;111(4):592–5.
 61. Tisdale MJ. The “cancer cachectic factor.” *Support Care Cancer.* 2003;11(2):73–8.
 62. Cariuk P, Lorite MJ, Todorov PT, Field WN, Wigmore SJ, Tisdale MJ. Induction of cachexia in mice by a product isolated from the urine of cachectic cancer patients. *Br J Cancer.* 1997;76:606–13.
 63. Teixeira C, Duarte J. Myonuclear domain in skeletal muscle fibers. A critical review. *Arch Exerc Heal* 2011;2(2):92–101.
 64. Skipworth RJE, Stewart GD, Ross JA, Guttridge DC, Fearon KCH. The molecular mechanisms of skeletal muscle wasting: Implications for therapy. *Surg.* 2006;4(5):273–83.
 65. Broussard SR, McCusker RH, Novakofski JE, Strle K, Shen WH, Johnson RW, Dantzer R, Kelley KW. IL-1 Impairs Insulin-Like Growth Factor I-Induced Differentiation and Downstream Activation Signals of the Insulin-Like Growth Factor I Receptor in Myoblasts. *J Immunol.* 2004;172(12):7713–20.
 66. Palus S, von Haehling S, Springer J. Muscle wasting: an overview of recent developments in basic research. *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* 2014;5(3):193–8.

67. Lundy C, Jacobs RA. Adaptations of skeletal muscle mitochondria to exercise training. *2015*;0:1–13.
68. Ferreira R, Vitorino R, Alves RMP, Appell HJ, Powers SK, Duarte JA, Amado F. Subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria proteome differences disclose functional specializations in skeletal muscle. *Proteomics*. 2010;10:3142–54.
69. Yen W-L, Klionsky DJ. How to live long and prosper: autophagy, mitochondria, and aging. *Physiology*. 2008;23(70):248–62.
70. Wallace DC. Mitochondria and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(10):685–98.
71. Herrington DM, Klein KP, David M, Pharmacogenet- KPK. Contractile activity-induced mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. 2001;27157(Mi):2776–84.
72. Fermoselle C, García-Arumí E, Puig-Vilanova E, Andreu AL, Urtreger AJ, de Kier Joffé EDB, Tejedor A, Puente-Maestu L, Barreiro E. Mitochondrial dysfunction and therapeutic approaches in respiratory and limb muscles of cancer cachectic mice. *Exp Physiol*. 2013;98(9):1349–65.
73. Fontes-Oliveira CC, Busquets S, Toledo M, Penna F, Aylwin MP, Sirisi S, Silva AP, Orpí M, García A, Sette A, Genovese MI, Oliván M, López-Soriano FJ, Argilés JM. Mitochondrial and sarcoplasmic reticulum abnormalities in cancer cachexia: Altered energetic efficiency? *Biochim Biophys Acta - Gen Subj*. 2013;1830(3):2770–8.
74. White JP, Baynes JW, Welle SL, Kostek MC, Matesic LE, Carson JA, Sato S, Carson JA. The regulation of skeletal muscle protein turnover during the progression of cancer cachexia in the *Apc(Min/+)* mouse. *PLoS One*. 2011;6(9):e24650.
75. Constantinou C, De Oliveira CCF, Mintzopoulos D, Busquets S, He J, Kesarwani M, Mindrinos M, Rahme LG, Argilés JM, Tzika AA. Nuclear magnetic resonance in conjunction with functional genomics suggests mitochondrial dysfunction in a murine model of cancer cachexia. *Int J Mol Med*. 2011;27(1):15–24.
76. Tzika a. Skeletal muscle mitochondrial uncoupling in a murine cancer cachexia model. *Int J Oncol*. 2013;886–94.
77. McLean JB, Moylan JS, Andrade FH. Mitochondria dysfunction in lung cancer-induced muscle wasting in C2C12 myotubes. *Front Physiol*. 2014;5(DEC):1–8.
78. Shum AMY, Mahendradatta T, Taylor RJ, Painter AB, Moore MM, Tsoli M, Tan TC, Clarke SJ, Robertson GR, Polly P. Disruption of MEF2C signaling and loss of sarcomeric and mitochondrial integrity in cancer-induced skeletal muscle wasting. *Aging (Albany NY)*. 2012;4(2):133–43.
79. Frezza C, Gottlieb E. Mitochondria in cancer: Not just innocent bystanders. *Semin Cancer Biol*. 2009;19(1):4–11.

80. Calvani R, Joseph A, Bossola M. Mitochondrial pathways in sarcopenia of aging and disuse muscle atrophy. *Biol Chem*. 2013;394(3):393–414.
81. Baker MJ, Palmer CS, Stojanovski D. Mitochondrial protein quality control in health and disease. *Br J Pharmacol*. 2014;171(8):1870–89.
82. Iqbal S, Hood DA. The role of mitochondrial fusion and fission in skeletal muscle function and dysfunction. *Front Biosci*. 2015;20:157–72.
83. Stotland A, Gottlieb RA. Mitochondrial quality control: Easy come, easy go. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1853(10):2802–11.
84. Kelly DP, Scarpulla RC. Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function. *Genes Dev*. 2004;18(4):357–68.
85. Scarpulla RC. Nucleus-encoded regulators of mitochondrial function: Integration of respiratory chain expression, nutrient sensing and metabolic stress. *Biochim Biophys Acta - Gene Regul Mech*. 2012;1819(9–10):1088–97.
86. Gleyzer N, Vercauteren K, Scarpulla RC. Control of mitochondrial transcription specificity factors (TFB1M and TFB2M) by nuclear respiratory factors (NRF-1 and NRF-2) and PGC-1 family coactivators. *Mol Cell Biol*. 2005;25(4):1354–66.
87. Brault JJ, Jespersen JG, Goldberg AL. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1alpha or 1beta overexpression inhibits muscle protein degradation, induction of ubiquitin ligases, and disuse atrophy. *J Biol Chem*. 2010;285(25):19460–71.
88. Chourasia AH, Boland ML, Macleod KF. Mitophagy and cancer. *Cancer Metab*. 2015;3(1):4.
89. Iqbal S, Ostojic O, Singh K, Joseph AM, Hood D a. Expression of mitochondrial fission and fusion regulatory proteins in skeletal muscle during chronic use and disuse. *Muscle Nerve*. 2013;48(6):963–70.
90. Klionsky DJ. Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(11):931–7.
91. Lu H, Li G, Liu L, Feng L, Wang X, Jin H. Regulation and function of mitophagy in development and cancer. *Autophagy*. 2013;9(11):1720–36.
92. Narendra DP, Jin SM, Tanaka A, Suen D-F, Gautier C a, Shen J, Cookson MR, Youle RJ. PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin. *PLoS Biol*. 2010;8(1):e1000298.
93. Masiero E, Agatea L, Mammucari C, Blaauw B, Loro E, Komatsu M, Metzger D, Reggiani C, Schiaffino S, Sandri M. Autophagy Is Required to Maintain Muscle Mass. *Cell Metab*. Elsevier Ltd; 2009;10(6):507–15.
94. Joseph A-M, Adhietty PJ, Wawrzyniak NR, Wohlgemuth SE, Picca A, Kujoth GC, Prolla TA, Leeuwenburgh C. Dysregulation of Mitochondrial Quality Control Processes Contribute

- to Sarcopenia in a Mouse Model of Premature Aging. *PLoS One*. 2013;8(7):e69327.
95. Aversa Z, Pin F, Lucia S, Penna F, Verzaro R, Fazi M, Colasante G, Tirone A, Fanelli FR, Ramaccini C, Costelli P, Muscaritoli M. Autophagy is induced in the skeletal muscle of cachectic cancer patients. *Sci Rep*. 2016;6:30340.
 96. Glick D, Barth S, Macleod KF. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol*. 2010;221(1):3–12.
 97. Tisdale M. Mechanisms of cancer cachexia. *Physiol Rev*. 2009;89(1):381–410.
 98. Helmark IC, Mikkelsen UR, Børglum J, Rothe A, Petersen MCH, Andersen O, Langberg H, Kjaer M. Exercise increases interleukin-10 levels both intraarticularly and peri-synovially in patients with knee osteoarthritis: a randomized controlled trial. *Arthritis Res Ther*. 2010;12:R126.
 99. Petersen a. MW, Pedersen BK. The anti-inflammatory effect of exercise. *J Appl Physiol*. 2005;98:1154–62.
 100. Lira FS, Rosa JC, Yamashita a S, Koyama CH, Batista ML, Seelaender M. Endurance training induces depot-specific changes in IL-10/TNF-alpha ratio in rat adipose tissue. *Cytokine*. 2008;45(December):80–5.
 101. Loureiro MM, Padrão AI, Duarte JA, Ferreira R. Impacto do exercício físico regular no catabolismo muscular subjacente à caquexia associada ao cancro. *Rev Port Ciências do Desporto*. 2014;14(2):95–109.
 102. Ferraro E, Giammarioli AM, Chiandotto S, Spoletini I, Rosano G. Exercise-Induced Skeletal Muscle Remodeling and Metabolic Adaptation: Redox Signaling and Role of Autophagy. *Antioxid Redox Signal*. 2014;21(1):154–76.
 103. Wilkinson SB, Phillips SM, Atherton PJ, Patel R, Yarasheski KE, Tarnopolsky MA, Rennie MJ. Differential effects of resistance and endurance exercise in the fed state on signalling molecule phosphorylation and protein synthesis in human muscle. *J Physiol*. 2008;586(15):3701–17.
 104. Bamman MM, Shipp JR, Jiang J, Gower B a, Hunter GR, Goodman a, McLafferty CL, Urban RJ. Mechanical load increases muscle IGF-I and androgen receptor mRNA concentrations in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2001;280(3):E383–90.
 105. Scott W, Stevens J, Stuart A, Scott W, Stevens J, Binder-macleod SA. Human Skeletal Muscle Fiber Type Classifications. 2001;81(11):1810–6.
 106. Lambertucci RH, Levada-Pires AC, Rossoni L V., Curi R, Pithon-Curi TC. Effects of aerobic exercise training on antioxidant enzyme activities and mRNA levels in soleus muscle from young and aged rats. *Mech Ageing Dev*. 2007;128(3):267–75.
 107. Wright DC, Geiger PC, Han D-H, Jones TE, Holloszy JO. Calcium Induces Increases in

- Peroxisome Proliferator-activated Receptor Coactivator-1 and Mitochondrial Biogenesis by a Pathway Leading to p38 Mitogen-activated Protein Kinase Activation. *J Biol Chem.* 2007;282(26):18793–9.
108. Jamart C, Francaux M, Millet GY, Deldicque L, Frère D, Féasson L. Modulation of autophagy and ubiquitin-proteasome pathways during ultra-endurance running. *J Appl Physiol.* 2012;112(9):1529–37.
 109. Qi Z, Zhang Y, Guo W, Ji L, Ding S. Increased Insulin Sensitivity and Distorted Mitochondrial Adaptations during Muscle Unloading. *Int J Mol Sci.* 2012;13(12):16971–85.
 110. Jamart C, Naslain D, Gilson H, Francaux M. Higher activation of autophagy in skeletal muscle of mice during endurance exercise in the fasted state. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2013;305(8):E964-74.
 111. Oliveira PA, Palmeira C, Colaço A, De La Cruz P LF, Lopes C. DNA Content Analysis, Expression of Ki-67 and p53 in Rat Urothelial Lesions Induced by N-Butyl-N-(4-Hydroxybutyl) Nitrosamine and Treated with Mitomycin C and Bacillus Calmette-Guérin. *Anticancer Res.* 2006;26(4 B):2995–3004.
 112. Sweat F, Rosenthal D, Puchtler H. Sirius Red F3BA as a stain for connective tissue. *Arch Pathol.* 1964;78(1):69–72.
 113. Lowry OH, Rosebrough NJ, Randall RJ, Farr AL. Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *Readings.* 1951;193(1):265–75.
 114. Simon N, Papa K, Vidal J, Boulamery A. Circadian Rhythms of Oxidative Phosphorylation: Effects of Rotenone and Melatonin on Isolated Rat Brain Mitochondria. *Chronobiol Int.* 2003;20(3):451–61.
 115. Laemmli UK. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature.* 1970;(227):680–5.
 116. Chavan S, Bray F, Lortet-Tieulent J, Goodman M, Jemal A. International variations in bladder cancer incidence and mortality. *Eur Urol. European Association of Urology;* 2014;66(1):59–73.
 117. Siegel RL, Jacobs EJ, Newton CC, Feskanich D, Freedman ND, Prentice RL, Jemal A. Deaths Due to Cigarette Smoking for 12 Smoking-Related Cancers in the United States. *JAMA Intern Med.* 2015;4:E1–3.
 118. Oliveira PA, Adegá F, Palmeira CA, Chaves RM, Colaço AA, Guedes-Pinto H, De La Cruz P LF, Lopes CA. DNA study of bladder papillary tumours chemically induced by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine in Fisher rats. *Int J Exp Pathol.* 2007;88(1):39–46.
 119. Ushmorov A, Hack V, Dröge W, Dro W. Differential Reconstitution of Mitochondrial Respiratory Chain Activity and Plasma Redox State by Cysteine and Ornithine in a Model of

- Cancer Cachexia Differential Reconstitution of Mitochondrial Respiratory Chain Activity and Plasma Redox State by Cysteine. *Cancer Res.* 1999;59:3527–34.
120. Dodson S, Baracos VE, Jatoi A, Evans WJ, Cella D, Dalton JT, Steiner MS. Muscle wasting in cancer cachexia: clinical implications, diagnosis, and emerging treatment strategies. *Annu Rev Med.* 2011;62:265–79.
 121. Argilés JM, López-soriano FJ. The Role of Cytokines in Cancer Cachexia. 1999;223–48.
 122. Argilés JM, Alvarez B, López-soriano FJ. The Metabolic Basis of Cancer Cachexia. 1997;17(5):477–98.
 123. Lattermann R, Geisser W, Georgieff M. Integrated Analysis of Glucose, Lipid, and Urea Metabolism in Patients With Bladder Cancer: Impact of Tumor Stage. 2003;9007(3):589–92.
 124. Xu X-S, Miao R-C, Zhang L-Q, Wang R-T, Qu K, Pang Q, Liu C. Model Based on Alkaline Phosphatase and Gamma- Glutamyltransferase for Gallbladder Cancer Prognosis. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2015;16(15):6255–9.
 125. West M, Maurice SA, Cohen J, Zimmerman HJ. Glycolytic and Oxidative Enzymes and Transaminases in Patients with Carcinoma of the Kidney, Prostate and Urinary Bladder. *Cancer Res.* 1963;17:432–7.
 126. Argilés JM, López-Soriano FJ. The role of cytokines in cancer cachexia. *Med Res Rev.* 1999;19(3):223–48.
 127. Pin F, Busquets S, Toledo M, Camperi A, Lopez-Soriano FJ, Costelli P, Argilés JM, Penna F. Combination of exercise training and erythropoietin prevents cancer-induced muscle alterations. *Oncotarget.* 2015;6(41):43202–15.
 128. 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. 2010;188(6):833–49.
 129. Romanello V, Guadagnin E, Gomes L, Roder I, Sandri C, Petersen Y, Milan G, Masiero E, Del Piccolo P, Foretz M, Scorrano L, Rudolf R, Sandri M. Mitochondrial fission and remodelling contributes to muscle atrophy. *EMBO J.* Nature Publishing Group; 2010;29(10):1774–85.
 130. Lira VA, Okutsu M, Zhang M, Greene NP, Laker RC, Breen DS, Hoehn KL, Yan Z. Autophagy is required for exercise training-induced skeletal muscle adaptation and improvement of physical performance. *FASEB J.* 2013;27(10):4184–93.
 131. Adhihetty PJ, Uguccioni G, Leick L, Hidalgo J, Pilegaard H, Hood D a. The role of PGC-1alpha on mitochondrial function and apoptotic susceptibility in muscle. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2009;297(1):C217–25.
 132. Maniura-Weber K, Goffart S, Garstka HL, Montoya J, Wiesner RJ. Transient overexpression

- of mitochondrial transcription factor A (TFAM) is sufficient to stimulate mitochondrial DNA transcription, but not sufficient to increase mtDNA copy number in cultured cells. *Nucleic Acids Res.* 2004;32(20):6015–27.
133. Lira VA, Okutsu M, Zhang M, Greene NP, Laker RC, Breen DS, Hoehn KL, Yan Z. Autophagy is required for exercise training-induced skeletal muscle adaptation and improvement of physical performance. *FASEB J.* 2013;27(10):4184–93.
 134. Samant SA, Zhang HJ, Hong Z, Pillai VB, Sundaresan NR, Wolfgeher D, Archer SL, Chan DC, Gupta MP. SIRT3 Deacetylates and Activates OPA1 To Regulate Mitochondrial Dynamics during Stress. *Mol Cell Biol.* 2014;34(5):807–19.
 135. Penna F, Baccino FM., Costelli P. Coming back: autophagy in cachexia. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2014;(17):241–6.
 136. Sandri M. Protein breakdown in muscle wasting: Role of autophagy-lysosome and ubiquitin-proteasome. *Int J Biochem Cell Biol.* Elsevier Ltd; 2013;45(10):2121–9.
 137. Ju J sun, Jeon S il, Park J young, Lee J young, Lee S cheol, Cho K jung, Jeong J moon. Autophagy plays a role in skeletal muscle mitochondrial biogenesis in an endurance exercise-trained condition. *J Physiol Sci.* Springer Japan; 2016;66(5):417–30.
 138. Youle RJ, Narendra DP. Mechanisms of mitophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011;12(1):9–14.