



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**  
Centro Biomédico  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Renata Alves

**Efeitos protetores do treinamento resistido sobre a miotoxicidade  
induzida pela doxorubicina em ratos**

Rio de Janeiro

2023

Renata Alves

**Efeitos protetores do treinamento resistido sobre a miotoxicidade induzida pela  
doxorrubicina em ratos**

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós- Graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Cristiane Matsuura

Rio de Janeiro

2023

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

A474 Alves, Renata.  
Efeitos protetores do treinamento resistido sobre a miotoxicidade induzida pela doxorubicina em ratos / Renata Alves. – 2023.  
88 f.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Cristiane Matsuura

Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental.

1. Exercícios físicos - Teses. 2. Doxorubicina - Teses. 3. Antraciclina - Teses. 4. Miotoxicidade. I. Matsuura, Cristiane. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 616.12-008.315

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira  
CRB7/6382

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

---

Assinatura

---

Data

Renata Alves

**Efeitos protetores do treinamento resistido sobre a miotoxicidade induzida pela  
doxorrubicina em ratos**

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós- Graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 06 de novembro de 2023.

Banca Examinadora:

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra Cristiane Matsuura (Orientadora)

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Elite Dalla Corte Frantz

Universidade Federal Fluminense

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Flavia Fonseca Bloise

Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Jemima Fuentes Ribeiro da Silva

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Sandra Barbosa da Silva

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Rio de Janeiro

2023

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus filhos **Arthur** e **Júlia** pelo amor incondicional e aos meus pais, **Helton** e **Márcia** e esposo **Gabriel** sem vocês eu não chegaria à conclusão desta tese.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS, por ter me dado saúde e força para superar todas as dificuldades durante todo o meu doutorado.

Meu agradecimento aos meus filhos, Arthur e Júlia, vocês são tudo na minha vida. Agradeço a Deus por me escolherem como mãe.

Ao meu pai, Helton Alves, por ter sido um modelo de caráter e retidão, pelo amor que me dedicou, aos seus sacrifícios diante a minha formação, aos ensinamentos que aprendi com ele, os quais foram de fundamental na minha formação pessoal.

A minha mãe Marcia Alves, pelo amor incondicional, dedicação, atenção, em todos os momentos na minha vida. Você foi a peça fundamental dessa conquista. Sem sua ajuda e apoio nada disso seria possível.

Ao meu esposo, Gabriel Fernandes, pelo amor, carinho, companheirismo e toda a compreensão ao longo desses anos. Obrigada por todos os incentivos e por muitas das vezes me por com os pés no chão e me desacelerar (rs). Amo você e a nossa família.

Ao meu irmão Marcelo Alves, pela grande ajuda nestes últimos anos, que foram fundamentais na minha formação.

Vocês estavam ao meu lado em cada decisão tomada, todas as vitórias conquistadas, e agradeço por toda dedicação, amor, carinho em toda a minha vida.

A minha orientadora, Dra. Cristiane Matsuura, por depositar confiança em mim e no meu trabalho. Gostaria de agradecer-lá por tudo o que foi e é na minha vida. Por ser essa pessoa ímpar, de um caráter e humanidade sem igual. Obrigada pelos ensinamentos, paciência, compreensão e cuidado. E desculpas por todos os percalços durante todo o meu doutorado. Sei que fui uma aluna singular (rs), afinal, enfrentamos uma pandemia e duas licenças maternidade pelo caminho. Obrigada por tudo!

Aos colegas do LTM&, por compartilharem conhecimento e alegria comigo. Em especial aos colegas Jefferson e Claudinha, que estiveram desde o início deste projeto. Jefferson, obrigada por toda ajuda e ao embarcar nas aventuras científicas comigo ao longo desses anos.

Às professoras Mariana e Marcelinha, por todo apoio e incentivo.

Aos parceiros e técnicos, Ana, Cherly, Victor e Thalita.

Aos amigos de laboratórios parceiros: Bia e Eliete da UFF, Dafne, Bia, Matehus, Lenize, Ricardinho e a todos os professores do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular e Plantas Mediciniais

Aos demais amigos e colegas, pelo apoio e incentivo.

A todos os professores, que de algum modo contribuíram para a formação do meu conhecimento e do meu caráter.

Aos meus familiares, que me apoiaram e incentivaram.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Humana e Experimental (BHEX) pela oportunidade de participar de um programa inovador e de qualidade ímpar.

À banca examinadora, por aceitar o convite para participar desse momento importante em minha trajetória acadêmica.

À CAPES - O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - nº 88882.450587/2019-01.

Os únicos limites das nossas realizações  
de amanhã são as nossas dúvidas e hesitações de hoje.

*Franklin Roosevelt*

## RESUMO

ALVES, Renata. *Efeitos protetores do treinamento resistido sobre a miotoxicidade induzida pela doxorubicina em ratos*. 2023. 88f. Tese (Doutorado em Biologia Humana e Experimental) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.

A doxorubicina (Dox) é um quimioterápico altamente eficaz da classe das antraciclina que está associado a uma infinidade de efeitos adversos graves, incluindo miotoxicidade. O objetivo do presente estudo é investigar se o treinamento resistido (TR) pode atenuar a toxicidade muscular esquelética induzida pela Dox em ratos pela modulação da expressão de proteínas envolvidas no equilíbrio proteico, apoptose, biogênese mitocondrial e possível participação do sistema renina-angiotensina. Além disso, verificar se as possíveis alterações diferem entre os músculos esqueléticos. Utilizamos ratos Sprague Dawley adultos machos que foram divididos aleatoriamente em Controle (NaCl/sedentário, n=10), Dox/Sed (Dox/sedentário, n=16) ou Dox/TR (Dox/treinado em resistência) grupos (n=16). Dox ou solução salina foram administrados por 10 dias (1 mg/kg/d, i.p.). O TR consistiu em subir uma escada vertical com 54 degraus com sobrecarga (15 repetições/d; 5 dias/sem; 20 a 60% da carga máxima; por 8 semanas). Após a eutanásia, os músculos sóleo e gastrocnêmio foram dissecados e processados para microscopia ou congelados para Western blot. O TR reduziu a mortalidade, a perda de peso e melhorou a força geral em comparação com Dox/Sed. Ratos Dox/Sed exibiram área transversal de miócitos significativamente menor, tanto do sóleo quanto do gastrocnêmio, em comparação com Controle e Dox/TR. Além disso, a TR mitigou os danos ultraestruturais aos músculos esqueléticos causados pela Dox. Micrografias eletrônicas de ambos os músculos de animais Dox/TR evidenciaram muitos campos com miofibrilas e sarcômeros regularmente dispostos, mitocôndrias preservadas e ausência de organelas que sugerem degradação proteica; em oposição às conclusões do grupo Dox/Sed. Essas alterações foram acompanhadas de maior atividade da Catalase comparada ao grupo Dox/TR e menor atividade da GPx comparada ao Controle. O grupo Dox/Sed apresentaram maior dano proteico comparado ao Controle. Além disso, a Dox reduziu níveis proteicos de Akt e p-Akt<sup>Ser473</sup>, mas sua relação não diferiu entre os grupos. No gastrocnêmio, a expressão de Rab 7 foi maior no grupo Dox/Sed do que no grupo Controle, já a ECA2 foi maior no grupo Dox/TR do que no grupo Dox/Sed. No sóleo, a expressão do citocromo C foi reduzida no grupo Dox/TR em comparação ao grupo Dox/Sed. Além disso, a expressão de PGC1- $\alpha$  foi reduzida no grupo Dox/Sed em comparação ao grupo Controle. Porém, o TR foi capaz de aumentar sua expressão. Já os níveis proteicos de ECA2 estavam reduzidos nos grupos tratados com Dox, no entanto, observamos que o TR aumentou os níveis proteicos da relação ECA/ECA2, que estavam reduzidos no grupo Dox/Sed. A expressão de p-P70S6K<sup>Thr389</sup>, MuRF-1, Atrogin-1, Caspase-3, AT1R, MasR, ECA, receptores da bradicinina, IL-6 e TNF- $\alpha$  foi semelhante entre os grupos em ambos os músculos. O TR mitigou a miotoxicidade derivada da Dox, ele foi eficaz em atenuar a mortalidade, em preservar a ultraestrutura dos músculos esqueléticos, em prevenir a atrofia de ambos os músculos, acompanhado da redução da relação ECA/ECA2 e redução de p-NF $\kappa$ B. Além disso, foi capaz de aumentar a expressão da proteína envolvida na biogênese mitocondrial. O TR realizado durante o tratamento com Dox pode ser uma abordagem valiosa para atenuar o dano muscular associado.

Palavras-chave: antraciclina; músculo esquelético; miotoxicidade; exercício.

## ABSTRACT

ALVES, Renata. *Protective effects of resistance training on doxorubicin-induced myotoxicity in rats*. 2023. 88f. Tese (Doutorado em Biologia Humana e Experimental) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.

Doxorubicin (Dox) is a highly effective chemotherapy drug from the anthracycline class that is associated with a multitude of serious adverse effects, including myotoxicity. The objective of the present study is to investigate whether resistance training (RT) can attenuate Dox-induced skeletal muscle toxicity in rats by modulating the expression of proteins involved in protein balance, apoptosis, mitochondrial biogenesis and possible participation of the renin-angiotensin system. Furthermore, check whether possible changes differ between skeletal muscles. Male adults Sprague Dawley rats were randomly divided into Control (NaCl/sedentary, n=10), Dox/Sed (Dox/sedentary, n=16), or Dox/RT (Dox/endurance-trained) groups (n=16). Dox or saline were administered for 10 days (1 mg/kg/d, i.p.). RT consisted of climbing a ladder apparatus with 54 steps with overload (15 repetitions/d; 5 days/week; 20 to 60% of maximum load; for 8 weeks). After euthanasia, skeletal muscles soleus and gastrocnemius were dissected and processed for microscopy or frozen for Western blot. RT reduced mortality, weight loss, and improved overall strength compared to Dox/Sed. Dox/Sed rats exhibited significantly lower myocyte cross-sectional area of both soleus and gastrocnemius compared to Control and Dox/RT. Furthermore, RT mitigated the ultrastructural damage to skeletal muscles caused by Dox. Electron micrographs of both muscles of Dox/RT animals showed many fields with regularly arranged myofibrils and sarcomeres, preserved mitochondria and absence of organelles that suggest protein degradation; in opposition to the conclusions of the Dox/Sed group. These changes were accompanied by greater Catalase activity compared to the Dox/RT group and lower GPx activity compared to the Control. However, the TR was able to reverse this situation. Dox/Sed group showed greater protein damage compared to the Control. Furthermore, Dox reduced protein levels of Akt and p-Akt<sup>Ser473</sup>, but their relationship did not differ between groups. In the gastrocnemius, Rab 7 expression was higher in the Dox/Sed group than in the Control group, while ACE2 was higher in the Dox/RT group than in the Dox/Sed group. In the soleus, cytochrome C expression was reduced in the Dox/RT group compared to the Dox/Sed group. Furthermore, PGC1- $\alpha$  expression was reduced in the Dox/Sed group compared to the Control group. However, RT was able to increase its expression. Protein levels of ACE2 were reduced in the groups treated with Dox, however, we observed that RT increased the protein levels of the ACE/ECA2 ratio, which were reduced in the Dox/Sed group. The expression of p-P70S6K<sup>Thr389</sup>, MuRF-1, Atrogin-1, Caspase-3, AT1R, MasR, ACE, bradykinin receptors, IL-6 and TNF- $\alpha$  was similar between groups in both muscles. RT mitigated Dox-derived myotoxicity, it was effective in attenuating mortality, preserving the ultrastructure of skeletal muscles, preventing atrophy of both muscles, accompanied by a reduction in the ACE/ACE2 ratio and a reduction in pNF $\kappa$ B. Furthermore, it was able to increase the expression of the protein involved in mitochondrial biogenesis. RT performed during Dox treatment may be a valuable approach to mitigate associated muscle damage.

Keywords: anthracyclines; skeletal muscle; myotoxicity; exercise.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Estrutura química da doxorubicina.....	22
Figura 2 –	Mecanismos moleculares envolvidos na miotoxicidade induzida por doxorubicina.....	32
Figura 3 –	Eixo ECA-Ang (1-7)-MasR contrarregulatório as ações deletérias do eixo ECA/Ang II/AT1R no desenvolvimento do remodelamento muscular patológico.....	37
Figura 4 –	Representação esquemática do protocolo experimental.....	45
Figura 5 –	Aparato para o treinamento resistido.....	46
Figura 6 –	Curva de sobrevivência.....	54
Figura 7 –	Acompanhamento da massa corporal ao longo do protocolo experimental.	55
Figura 8 –	Ingestão alimentar dos animais ao longo das 8 semanas.....	56
Figura 9 –	Teste de carga máxima inicial, intermediário e ao final das 8 semanas.....	57
Figura 10 –	Fotomicrografia representativas de cortes transversais dos músculos esqueléticos corados com hematoxilina e eosina e a área de secção transversa média.....	58
Figura 11 –	Micrografias eletrônicas representativas do músculo sóleo.....	60
Figura 12 –	Micrografias eletrônicas representativas do músculo gastrocnêmio superficial.....	61
Figura 13 –	Biomarcadores de estresse oxidativo no músculo gastrocnêmio.....	62
Figura 14 –	Expressão proteica de marcadores envolvidos no anabolismo.....	63
Figura 15 –	Expressão proteica de marcadores envolvidos na proteólise muscular.....	64

Figura 16 –	Expressão proteica de marcadores envolvidos na apoptose.....	65
Figura 17 –	Expressão proteica de marcador envolvido na biogênese mitocondrial....	66
Figura 18 –	Expressão proteica dos componentes do SRA.....	67
Figura 19 –	Expressão proteica dos receptores de bradicinina.....	68
Figura 20 –	Expressão de proteínas envolvidas na inflamação.....	69

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estudos que avaliaram o efeito do treinamento resistido em músculos esqueléticos após tratamento com a doxorrubicina.....	41
Tabela 2 – Tabela de descrição do treinamento resistido.....	47
Tabela 3 – Anticorpos utilizados nos ensaios de <i>Western Blotting</i> .....	52
Tabela 4 – Massa corporal e massa dos músculos esqueléticos.....	55

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP	Adenosina difosfato
Akt	Proteína serina/treonina quinase
ATP	Adenosina trifosfato
AT1R	Receptor tipo 1 da angiotensina
AT2R	Receptor tipo 2 da angiotensina
Ang 1-7	Angiotensina 1-7
Ang II	Angiotensina II
ANOVA	Análise de variância
AST	Área de secção transverssa
CAT	Catalase
CEUA	Comitê de ética no uso de animais
Cu <sup>2+</sup>	Íon cúprico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNPH	2,4-dinitrofenilhidrazina
Dox	Doxorrubicina
Dox/Sed	Grupo doxorrubicina + sedentário
Dox/TR	Grupo doxorrubicina + treinamento resistido
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina
EPM	Erro padrão da média
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
EROs	Espécies reativas de oxigênio

Fe <sup>2+</sup>	Íon ferroso
Fe <sup>3+</sup>	Íon férrico
GPx	Glutathione peroxidase
HCl	Ácido clorídrico
HE	Hematoxilina e eosina
H <sub>2</sub> O	Água
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
i.p	Intraperitoneal
IL	Interleucina
KCl	Cloreto de potássio
MC	Massa Corporal
MuRF	<i>Muscle RING Finger</i>
mTOR	Alvo da rapamicina em mamíferos
NaCl	Cloreto de sódio
NADPH	Nicotina adenina dinucleotídeo fosfato
NFκB	Fator nuclear kappa B
NOX2	NADPH oxidase 2
OH	Hidróxido
O <sub>2</sub>	Oxigênio
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Ânion superóxido
RI	Resto ingestão
RM	Repetição máxima

SOD	Superóxido dismutase
TBARS	Substâncias que reagem ao Ácido Tiobarbitúrico
TCA	Ácido Tricloroacético
TGF- $\beta$	Fator de transformação do crescimento beta
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
TR	Treinamento resistido
UPS	<i>Ubiquitin Proteasome System</i>
$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$\kappa$	Kappa

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	18
1	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	21
1.1	<b>Doxorrubicina</b> .....	21
1.1.1	<u>Caracterização e uso clínico</u> .....	21
1.1.2	<u>Mecanismo de ação antitumoral</u> .....	22
1.1.3	<u>Efeitos adversos</u> .....	23
1.2	<b>Toxicidade muscular esquelética induzida por doxorrubicina</b> .....	24
1.2.1	<u>Doxorrubicina e atrofia do músculo esquelético</u> .....	26
1.2.2	<u>Doxorrubicina e estresse oxidativo no músculo esquelético</u> .....	27
1.2.3	<u>Doxorrubicina e proteólise e apoptose no músculo esquelético</u> .....	29
1.2.4	<u>Doxorrubicina e autofagia no músculo esquelético</u> .....	30
1.2.5	Doxorrubicina e prejuízo na síntese muscular.....	32
1.2.6	Participação do Sistema Renina-Angiotensina (SRA).....	33
1.3	<b>Estratégias para atenuar os efeitos adversos</b> .....	37
1.3.1	<u>Treinamento resistido</u> .....	39
1.4	<b>Justificativa</b> .....	42
2	<b>OBJETIVO</b> .....	43
2.1	<b>Objetivo geral</b> .....	43
2.2	<b>Objetivo específico</b> .....	43
3	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	44
3.1	<b>Ética na pesquisa</b> .....	44
3.2	<b>Animais</b> .....	44
3.2.1	<u>Grupos experimentais</u> .....	44
3.3	<b>Administração da doxorrubicina e solução salina</b> .....	45

3.4	<b>Treinamento resistido</b> .....	46
3.4.1	<u>Familiarização do exercício</u> .....	46
3.4.2	<u>Determinação da carga máxima</u> .....	47
3.4.3	<u>Sessões de treinamento resistido</u> .....	47
3.5	<b>Massa corporal e ingestão alimentar</b> .....	48
3.6	<b>Eutanásia e isolamento de órgãos</b> .....	48
3.7	<b>Análise histológicas</b> .....	48
3.7.1	<u>Microscopia de luz</u> .....	48
3.7.2	<u>Microscopia eletrônica</u> .....	49
3.8	<b>Biomarcadores de estresse oxidativo</b> .....	49
3.8.1	<u>Atividade da enzima catalase</u> .....	49
3.8.2	<u>Atividade da enzima glutathione peroxidase</u> .....	50
3.8.3	<u>Avaliação da peroxidação lipídica</u> .....	50
3.8.4	<u>Avaliação da carbonilação de proteínas</u> .....	50
3.9	<b>Expressão proteica por <i>Western Blotting</i></b> .....	51
3.10	<b>Análise de dados</b> .....	52
4	<b>RESULTADOS</b> .....	54
4.1	<b>Sobrevida</b> .....	54
4.2	<b>Massa corporal, massa do músculo sóleo e gastrocnêmio</b> .....	54
4.3	<b>Ingestão alimentar</b> .....	56
4.4	<b>Treinamento resistido e força</b> .....	56
4.5	<b>Análise por microscopia de luz</b> .....	57
4.6	<b>Análise por microscopia eletrônica de transmissão</b> .....	58
4.7	<b>Biomarcadores de estresse oxidativo em homogenato do músculo gastrocnêmio</b> .....	61
4.8	<b>Expressão de proteínas por <i>Western Blotting</i></b> .....	62
4.8.1	<u>Marcadores de síntese proteica</u> .....	62

4.8.2	<u>Marcadores de proteólise muscular</u> .....	64
4.8.3	<u>Marcadores de apoptose</u> .....	65
4.8.4	<u>Marcador de biogênese mitocondrial</u> .....	65
4.8.5	<u>Componentes do SRA</u> .....	66
4.8.6	<u>Inflamação</u> .....	68
5	<b>DISCUSSÃO</b> .....	70
	<b>CONCLUSÃO</b> .....	77
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	78
	<b>ANEXO - Aprovação do Comitê de Ética</b> .....	88

## INTRODUÇÃO

A doxorubicina é um quimioterápico altamente eficaz da classe das antraciclinas que está associado a uma infinidade de efeitos adversos graves, incluindo miotoxicidade (HYDOCK; LIEN; JENSEN; SCHNEIDER *et al.*, 2011). Sabe-se que a caquexia, uma condição patológica que se caracteriza pela perda involuntária de massa corporal, especialmente de massa muscular, é comum no câncer e pode ser devida à própria doença, e agravada pelos efeitos tóxicos do tratamento (GUIGNI; CALLAHAN; TOURVILLE; MILLER *et al.*, 2018). A atrofia muscular esquelética induzida pela quimioterapia pode ocorrer independentemente da perda de massa corporal e contribuir para a fadiga e incapacidade física dos pacientes (CAAN; FELICIANO; PRADO; ALEXEEFF *et al.*, 2018).

Embora os mecanismos de toxicidade ainda estejam em debate, acredita-se que estão associados, em parte, a um aumento na geração de espécies reativas de oxigênio, com consequente ativação de vias proteolíticas e apoptóticas (SMUDER; KAVAZIS; MIN; POWERS, 2011b). Mesmo o estresse oxidativo leve aumenta a degradação proteica no músculo esquelético, causando um aumento na expressão dos principais componentes da via ubiquitina-proteassoma (UPS), como atrogina-1 e MuRF1 (JANG; RODRIGUEZ; LUSTGARTEN; MULLER *et al.*, 2020). É bem reconhecido que a superativação do UPS é necessária para atrofia muscular esquelética, e que a atrogina-1 inibe a indução de hipertrofia dependente de Akt (LI; WILLIS; LOCKYER; MILLER *et al.*, 2007). A manutenção da massa muscular é um equilíbrio delicado entre a síntese proteica e os sistemas de degradação proteica e, portanto, a doxorubicina pode favorecer a atrofia muscular.

Além da ativação proteolítica causada diretamente pela doxorubicina por meio de espécies reativas de oxigênio, a hiperativação neuro-hormonal característica da insuficiência cardíaca, incluindo sistema nervoso simpático e renina angiotensina aldosterona (SRAA, principalmente angiotensina II), pode ser um gatilho secundário para ativação de vias de proteólise e de apoptose (SAITOH; ISHIDA; DOEHNER; VON HAEHLING *et al.*, 2017). Além disso, citocinas pró-inflamatórias como TNF-alfa, IL-1, IL-6 e membros da família TGF-beta também parecem ter um papel importante na degradação muscular (SAITOH; ISHIDA; DOEHNER; VON HAEHLING *et al.*, 2017). Estudos experimentais evidenciaram que a doxorubicina aumenta a expressão miocárdica do subtipo 1 do receptor de angiotensina (AT1r), reduz a do subtipo (AT2r) e reduz os níveis circulantes de Ang (1-7) (ZONG; YANG; CHEN; HUANG *et al.*, 2011). Hoje, sabe-se que o SRAA é composto por diferentes eixos que se

contrapõem e se equilibram. A via clássica de sinalização envolve a conversão de angiotensina I em angiotensina II pela enzima conversora de angiotensina (ECA) e a sinalização via receptores AT1 e AT2. A ativação de receptores AT1 no músculo esquelético está associada à ativação de vias inflamatórias e aumento da atividade da NADPH oxidase, uma importante enzima produtora de espécies reativas de oxigênio. Além disso, a infusão direta de angiotensina II causa um quadro de caquexia, com redução da massa corporal devida principalmente à redução da massa muscular secundária a um aumento do catabolismo proteico em músculo esquelético (BRINK; PRICE; CHRAST; BAILEY *et al.*, 2001; DU BOIS; PABLO TORTOLA; LODKA; KNY *et al.*, 2015). Por outro lado, a ECA2, uma enzima homóloga à ECA, converte a angiotensina II e angiotensina (1-7) que, por sua vez, exerce suas ações via receptor Mas. Esse eixo parece se contrapor às ações deletérias da ativação dos receptores AT1, resultando em efeitos antifibróticos e antiapoptóticos (ÁBRIGO; SIMON; CABRERA; CABELLO-VERRUGIO, 2016; SANTOS; FERREIRA; VERANO-BRAGA; BADER, 2013). Apesar da reconhecida importância do SRAA na modulação do metabolismo proteico, pouco se sabe sobre os efeitos do exercício físico sobre o mesmo. Foi demonstrado que o exercício reduz os níveis circulantes de angiotensina II (MOUSA; LIU; CORNISH; ZUCKER, 2008) e que pode alterar o equilíbrio do SRAA em direção ao eixo não-clássico “protetor” ECA2-angiotensina (1-7)-receptor Mas em modelo de insuficiência cardíaca isquêmica (GOMES-SANTOS; FERNANDES; COUTO; FERREIRA-FILHO *et al.*, 2014) e em obesidade induzida por dieta (FRANTZ; GIORI; MACHADO; MAGLIANO *et al.*, 2017).

Infelizmente, ainda não há estratégias terapêuticas completamente eficazes para prevenir as alterações deletérias causadas diretamente pela doxorrubicina, melhorar a qualidade de vida do paciente e reduzir a morbidade. O treinamento aeróbio tem se mostrado eficaz para minimização da cardiomiopatia (KOUZI; UDDIN, 2016) e algumas evidências oriundas do grupo do Prof. Scott K. Powers sugerem que ele possa atenuar a ativação de vias proteolíticas, autofágicas e apoptóticas em músculo esquelético (KAVAZIS; SMUDER; POWERS, 2014; SMUDER; KAVAZIS; MIN; POWERS, 2011b). Apesar dos benefícios demonstrados do treinamento aeróbio, o treinamento resistido é o principal tipo de intervenção para prevenção e aumento da massa muscular esquelética, da força e resistência em qualquer população (GARBER; BLISSMER; DESCHENES; FRANKLIN *et al.*, 2011). Além disso, é classicamente conhecido por ativar vias fisiológicas de síntese de proteínas musculares. Portanto, aqui investigamos os efeitos do treinamento resistido na morfologia do músculo esquelético e na modulação do equilíbrio proteico em ratos tratados com doxorrubicina. Além

disso, verificamos a possível participação do SRA nesse contexto. Um objetivo secundário foi avaliar se quaisquer alterações observáveis seriam diferentes entre os músculos com um predomínio de tipos de fibras tipo I (sóleo) ou tipo II (gastrocnêmio superficial).

## 1 REVISÃO DA LITERATURA

### 1.1 Doxorrubicina

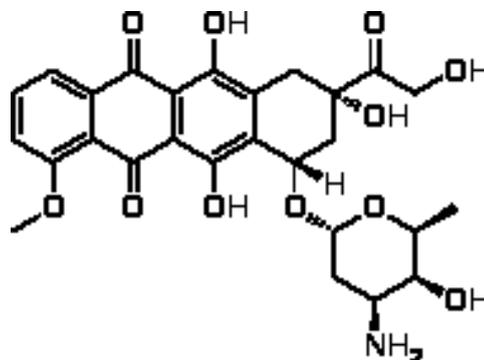
#### 1.1.1 Caracterização e uso clínico

A doxorrubicina, também conhecida como adriamicina, é um antibiótico pertencente à família das antraciclinas, que foi desenvolvido na década de 1960 a partir da bactéria *Streptomyces peucetius* var. *caesuis* (DI MARCO, 1969) e que permanece como um dos agentes antitumorais mais utilizados até hoje em função da sua eficácia contra um amplo espectro de malignidades. É aprovada pelas agências regulatórias para o tratamento de diversos tumores, tanto hematológicos quanto sólidos, em pacientes adultos e pediátricos. Esses tumores incluem linfomas, sarcomas, cânceres de mama, fígado, próstata, ovários entre outros (SINGAL; ILISKOVIC, 1998).

Na clínica, sua administração é feita pela via intravenosa em ciclos, cujo número e dose por ciclo difere conforme o esquema de tratamento utilizado (agente único ou em combinação com outros quimioterápicos) e a indicação clínica. Como exemplo, em um dos esquemas para o tratamento de câncer de mama, recomenda-se a dose de  $60 \text{ mg/m}^2$  a cada 21 dias por quatro ciclos associado à ciclofosfamida. Em outro esquema, em associação ao docetaxel e à ciclofosfamida, são feitos seis ciclos de  $50 \text{ mg/m}^2$  a cada 21 dias (BRENNER; DUGGAL; NATALE, 2023). É importante mencionar que, independentemente do esquema empregado, a dose total cumulativa não deve ultrapassar  $550 \text{ mg/m}^2$  em adultos e  $250 \text{ mg/m}^2$  em pacientes pediátricos em função do seu potencial cardiotoxico. O risco de cardiomiopatia é atenuado com o uso da formulação lipossomal peguilada da doxorrubicina (RAYSON; SUTER; JACKISCH; VAN DER VEGT *et al.*, 2012), na qual o fármaco é encapsulado em lipossomas, proporcionando uma liberação mais direcionada e controlada da substância ativa (SLINGERLAND; GUCHELAAR; GELDERBLON, 2012).

A estrutura da doxorrubicina é composta por quatro anéis aromáticos fusionados, conferindo-lhe grande estabilidade estrutural. Além disso, a molécula contém grupos funcionais, como grupos hidroxila (-OH) e grupos cetona (C=O), que desempenham um papel fundamental na interação da substância com biomoléculas, como o DNA e as proteínas celulares (ROCHETTE; GUENANCIA; GUDJONCIK; HACHET *et al.*, 2015).

Figura 1 – Estrutura química da doxorubicina



Fonte: DE LIMA FILHO; PEREIRA; DA SILVA *et al.*, 2020.

### 1.1.2 Mecanismo de ação antitumoral

O mecanismo de ação antitumoral da doxorubicina é complexo e ainda não está totalmente esclarecido; no entanto, sabe-se que o principal alvo é o DNA presente nas células cancerosas. A doxorubicina exerce a sua ação principalmente no núcleo das células, onde atinge concentrações até 50 vezes superior à do citoplasma, e seu mecanismo de ação é baseado em sua capacidade de interferir com a replicação do DNA e a síntese de proteínas nas células cancerosas (TAKANASHI; BACHUR, 1976).

A doxorubicina intercala-se entre as bases nitrogenadas do DNA. Quando a doxorubicina se insere entre as bases do DNA, ela causa uma distorção na estrutura helicoidal da molécula de DNA. Essa intercalação impede a correta replicação e transcrição do DNA, bloqueando assim a síntese de novas cadeias de DNA e inibindo a divisão celular. A quebra da integridade do DNA também pode levar à formação de fragmentos de DNA danificados (ROCHETTE; GUENANCIA; GUDJONCIK; HACHET *et al.*, 2015).

Outro efeito da doxorubicina é a inibição da ação da enzima topoisomerase II, que é responsável por controlar o enrolamento e desenrolamento do DNA durante a replicação. As topoisomerases são uma família de enzimas essenciais no controle do ciclo celular, desempenhando papel importante nos processos de replicação e empacotamento de DNA (TOMICIC; KAINA, 2013). A topoisomerase do tipo II atua realizando quebras transitórias da fita dupla no DNA, acompanhadas da hidrólise de ATP em ADP + Pi, sendo subclassificadas em topoisomerase dos tipos IIA e IIB com base em suas sequências de aminoácidos. Por ser amplamente expressa em células tumorais, torna-se alvo de diversos agentes antitumorais

(ROCHETTE; GUENANCIA; GUDJONCIK; HACHET *et al.*, 2015). A doxorubicina

se liga ao DNA e forma um complexo estável junto com a Topoisomerase II (Dox-DNA-Topoisomerase II), este pode induzir a quebra da dupla fita de DNA e levando a morte celular (CHAMPOUX, 2001; HANDE, 2008).

Além disso, a doxorubicina provoca danos devido à produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs). A geração de EROs mediada pela doxorubicina ocorre por duas vias distintas: a via enzimática, através do citocromo P450, e a via não enzimática, envolvendo reações da doxorubicina com íons de ferro. A formação de complexos entre a doxorubicina e o ferro pode catalisar uma reação de Fenton, na qual íons de metais de transição, como  $\text{Fe}^{2+}$  ou  $\text{Cu}^{2+}$ , reduzem o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) para formar o radical hidroxila altamente reativo ( $\text{HO}\cdot$ ). Esse processo resulta na geração de EROs, uma vez que o  $\text{Fe}^{2+}$  é oxidado pelo peróxido de hidrogênio para  $\text{Fe}^{3+}$ , gerando  $\text{HO}\cdot$  no processo. O radical  $\text{HO}\cdot$  é extremamente prejudicial ao organismo, pois pode causar danos em várias macromoléculas, incluindo DNA, RNA, proteínas, lipídios e membranas celulares, tanto no núcleo quanto nas mitocôndrias, podendo induzir a morte celular (FANG; NAKAMURA; IYER, 2007).

O excesso de EROs, por sua vez, têm a capacidade de ativar vias de proteólises, necrose e apoptose celular (ROCHETTE; GUENANCIA; GUDJONCIK; HACHET et al., 2015). Um exemplo disso é que altas concentrações da doxorubicina pode aumentar a afinidade da proteína p53 com o DNA, ativando a cascata de caspases e induzindo a apoptose através da sobre-regulação de Bax (CHANG; LEE; LIU; LIN et al., 2011; FANG; NAKAMURA; IYER, 2007; ROCHETTE; GUENANCIA; GUDJONCIK; HACHET et al., 2015).

É importante destacar que a entrada da doxorubicina nas células não é seletiva, o que significa que ela pode penetrar tanto em células normais quanto em células cancerosas. Esse fenômeno pode resultar em efeitos colaterais adversos que afetam diferentes tecidos do organismo.

### 1.1.3 Efeitos adversos

Segundo o Instituto Nacional do Câncer, os quimioterápicos atingem principalmente em estruturas que se renovam regularmente, como mucosa intestinal, medula óssea e os pelos. Os efeitos adversos relacionados à quimioterapia evoluem desde a mudança no humor, fadiga, dor, até mesmo, problemas de pele e sono. No tratamento no câncer de mama, no qual a doxorubicina é amplamente utilizada, por exemplo, os efeitos adversos vão desde alopecia, anorexia, náuseas, vômitos, diarreia, desconforto muscular, sarcopenia, até doenças cardiovasculares e diabetes.

É importante ressaltar que a gravidade e a incidência desses efeitos adversos podem variar de paciente para paciente, dependendo da dose, duração do tratamento e susceptibilidade individual. A equipe médica que administra a doxorubicina monitora de perto os pacientes para detectar e gerenciar esses efeitos adversos, e os benefícios do tratamento geralmente superam os riscos, especialmente no contexto do tratamento do câncer. A cardiotoxicidade, no entanto, é um efeito adverso sério e requer monitoramento rigoroso da função cardíaca dos pacientes durante e após o tratamento com doxorubicina.

A cardiotoxicidade associada à doxorubicina representa uma considerável limitação no uso desse fármaco. A ocorrência de problemas cardíacos tende a aumentar significativamente com doses cumulativas acima de 550 mg/m<sup>2</sup> de superfície corporal (BASSER; GREEN, 1993). No entanto, estudos realizados com sobreviventes de câncer têm demonstrado a possibilidade de desenvolver cardiomiopatia mesmo em pacientes que receberam doses cumulativas tão baixas quanto 240 mg/m<sup>2</sup> (LEVIS; BINKLEY; SHAPIRO, 2017).

Em um estudo multicêntrico envolvendo 630 pacientes diagnosticados com câncer em tratamento quimioterápico, foi observado que a incidência de cardiomiopatia variou de acordo com as doses acumuladas de doxorubicina. Por exemplo, 5% dos pacientes tratados com doxorubicina e expostos a uma dose cumulativa de 400 mg/m<sup>2</sup> apresentaram cardiomiopatia, enquanto 16% dos pacientes com uma dose de 500 mg/m<sup>2</sup>, 26% com 550 mg/m<sup>2</sup> e 48% com 700 mg/m<sup>2</sup> desenvolveram essa condição (SWAIN; WHALEY; EWER, 2003).

Além disso, a doxorubicina tem potencial de causar toxicidade em outros órgãos como rins (AYLA; SECKIN; TANRIVERDI; CENGIZ *et al.*, 2011), fígado (PRASANNA; RENU;

GOPALAKRISHNAN, 2020), músculo esquelético (HYDOCK; LIEN; JENSEN; SCHNEIDER *et al.*, 2011), entre outros.

## 1.2 Toxicidade muscular esquelética induzida por doxorubicina

Embora a cardiotoxicidade seja o efeito adverso mais grave e conhecido do tratamento com doxorubicina, ela também pode causar disfunção muscular esquelética. Atrofia das fibras musculares e rarefação mitocondrial foram observadas em biópsias do músculo vasto lateral de pacientes com câncer de mama submetidos à quimioterapia (GUIGNI; CALLAHAN; TOURVILLE; MILLER *et al.*, 2018). Além disso, os efeitos delegados à doxorubicina no

músculo esquelético podem levar a fadiga, redução da capacidade de realizar atividades diárias, comprometendo a qualidade de vida. De fato, a avaliação da fadiga em pacientes sob o tratamento à base de antraciclina revelou que 47% documentam fadiga de grau 4, categorizada como incapacitante e afetando as capacidades físicas dos pacientes (GILLIAM; ST. CLAIR, 2011).

O efeito da doxorubicina no músculo esquelético em um modelo pré-clínico foi publicado pela primeira vez em 1985, quando Doroshov e colaboradores demonstraram graves mudanças ultraestruturais no diafragma de ratos tratados com uma única injeção intraperitoneal em bolus de doxorubicina (DOROSHOW; TALLENT; SCHECHTER, 1985). A microscopia eletrônica de transmissão revelou edema intersticial, extensa degradação de organelas, fragmentação nuclear, presença de figuras de mielina e desorganização das miofibrilas. Por outro lado, os efeitos da doxorubicina no gastrocnêmio foram mais leves, com aumento do tamanho e número de gotículas lipídicas e alguma evidência de desorganização miofibrilar em alguns miócitos. Os autores atribuíram o padrão distinto de lesão muscular aos níveis detectados de doxorubicina no diafragma, que foram 50 vezes maiores do que no gastrocnêmio, provavelmente devido à administração intraperitoneal (DOROSHOW; TALLENT; SCHECHTER, 1985). Como as fibras musculares do tipo I são oxidativas e contêm maior número de mitocôndrias, pode-se levantar a hipótese de que uma maior quantidade de espécies reativas de oxigênio (EROs) poderia ser gerada, tornando-as mais suscetíveis ao dano oxidativo da doxorubicina.

Estudos subsequentes ratificaram os efeitos adversos da doxorubicina sobre a biologia do músculo esquelético promovendo hipotrofia, fraqueza, fadiga e redução da capacidade funcional em pacientes e esses sintomas podem persistir até cinco anos após o tratamento com a doxorubicina (FABRIS; MACLEAN, 2015; MEESKE; SMITH; ALFANO; MCGREGOR *et al.*, 2007).

Desta forma, a compreensão desses efeitos é crucial para melhorar a qualidade de vida dos pacientes em tratamento de câncer e desenvolver estratégias para mitigar os danos causados pelo tratamento quimioterápico.

Os principais mecanismos envolvidos nas alterações do músculo esquelético associadas ao tratamento com a doxorubicina serão descritos a seguir.

### 1.2.1 Doxorrubicina e atrofia do músculo esquelético

A atrofia muscular é definida como uma perda de massa muscular esquelética que resulta em perda de força muscular e o desenvolvimento precoce de fadiga (LYON; LÓPEZ-FERNÁNDEZ; COUCH; ASTEGGIANO *et al.*, 2022). A atrofia pode ser causada por fatores fisiológicos, patológicos, neurogênicos ou ambientais, incluindo os efeitos tóxicos de algumas classes de medicamentos. Estimativas indicam que até 80% dos pacientes com câncer experimentam perda de peso excessiva (ARGILÉS; BUSQUETS; STEMMLER; LÓPEZ-SORIANO, 2014; VON HAEHLING; ANKER, 2014). Acredita-se que essa perda de peso se deva, em grande parte, à diminuição excessiva da massa muscular esquelética. A prevalência de atrofia muscular varia de 14% em pacientes com câncer de mama em estágio inicial a 27% em pacientes com câncer de mama avançado, e alcança níveis mais significativos, entre 55% e 56%, em pacientes com linfoma não-Hodgkin. A perda de massa muscular pode ser causada pelo estado hipermetabólico e inflamatório da doença em si, mas que pode ser agravado pelo tratamento antineoplásico. Estudos pré-clínicos demonstraram que a quimioterapia isoladamente, independente de doença neoplásica, pode promover perda muscular (DAMRAUER; STADLER; ACHARYYA; BALDWIN *et al.*, 2018; GARCIA; CATA; DOUGHERTY; SMITH, 2008).

Uma metanálise conduzida por Hiensch *et al.* (2020) demonstrou que o tratamento com a doxorrubicina reduziu significativamente a massa do músculo esquelético em 14% em comparação ao controle veículo, acompanhada de redução da área de secção transversa (AST) da fibra muscular. Especificamente, o tratamento com doxorrubicina em ratos provocou uma redução da AST das fibras musculares tipo I (contração lenta oxidativa), tipo IIa (contração rápida glicolítica oxidativa) e tipo IIx/b (contração rápida glicolítica) nos músculos diafragma, plantaris e sóleo (HIENSCH; BOLAM; MIJWEL; JENESON *et al.*, 2020), mostrando assim que os prejuízos contrateis são observados em todos os fenótipos de fibras musculares. No entanto a magnitude do dano pode diferir entre os diferentes tipos de fibras.

Em paralelo com a redução da massa muscular esquelética, estudos demonstraram que o tratamento com a doxorrubicina causa alterações no metabolismo energético da célula e nos canais de cálcio, e estão associados a uma redução da capacidade do músculo esquelético de gerar força, da força máxima de contração e fadiga (BREDAHL; BUSEKRUS; HYDOCK, 2020; BREDAHL; PFANNENSTIEL; QUINN; HAYWARD *et al.*, 2016; GILLIAM; FISHERWELLMAN; LIN; MAPLES *et al.*, 2013; HAYWARD; HYDOCK; GIBSON; GREUFE *et al.*, 2013; HYDOCK; LIEN; JENSEN; SCHNEIDER *et al.*, 2011). Gilliam *et al.* (2011), por

exemplo, mostrou um agravamento da função do diafragma após o uso da doxorubicina, resultando em uma depressão de aproximadamente 50% a 60% na força máxima absoluta em animais submetidos ao tratamento com esse medicamento. Mesmo quando normalizada em relação à AST das fibras musculares, a força específica permaneceu deprimida (GILLIAM; ST. CLAIR, 2011).

Em um outro estudo, observou que as reduções na função do músculo esquelético, avaliadas através da medida da força de contração máxima, estavam diretamente relacionadas com a dose administrada. O tratamento com doxorubicina a uma dose de 10 mg/kg, 12,5 mg/kg e 15 mg/kg resultou em uma diminuição de 45%, 60% e 74%, respectivamente, na força de contração máxima do músculo sóleo em ratos (HYDOCK; LIEN; JENSEN; SCHNEIDER et al., 2011). Sabe-se que a atrofia muscular é um processo complexo que ocorre com aumento da degradação e redução da síntese proteica, a seguir será discutido os principais mecanismos para atrofia do músculo esquelético associada ao tratamento com doxorubicina.

### 1.2.2 Doxorubicina e estresse oxidativo no músculo esquelético

Um dos mecanismos propostos para explicar a miotoxicidade causada pela doxorubicina é caracterizada por um desequilíbrio redox que resulta em prejuízo na sinalização e função celular devido à produção suprafisiológica de EROs (MONTALVO; DOERR; NGUYEN; KELLEY et al., 2021). A doxorubicina aumenta a geração de EROs nas células por meio de diversos mecanismos, incluindo (1) a redução de um elétron de sua molécula, formando uma semiquinona capaz de reduzir o oxigênio, (2) a renovação metabólica da doxorubicina, que gera intermediários e produtos altamente reativos, e (3) a interação direta entre a doxorubicina e íons metálicos, como o ferro (CAPPETTA; DE ANGELIS; SAPIO; PREZIOSO et al., 2017; MONTALVO; DOERR; NGUYEN; KELLEY et al., 2021),

mecanismo estes, explicado anteriormente com um dos mecanismos de ação antitumoral da doxorubicina.

A farmacocinética da doxorubicina demonstra uma forte afinidade por componentes como a cardiolipina (componente da membrana mitocondrial interna), levando à sua acumulação no complexo mitocondrial I (BERTHIAUME; WALLACE, 2007). Essa acumulação resulta na superprodução de EROs dentro das mitocôndrias, o que pode levar a mutações no DNA mitocondrial, danos aos componentes da cadeia respiratória mitocondrial, alterações na permeabilidade da membrana mitocondrial, perturbações na homeostase do cálcio

e redução nos sistemas de defesa antioxidante (BERTHIAUME; WALLACE, 2007; DOROSHOW; DAVIES, 1986).

Gilliam et al. (2013) e Gilliam et al. (2016) realizaram avaliações da função mitocondrial em feixes de fibras permeabilizadas, utilizando o músculo gastrocnêmio e o sóleo, respectivamente. Em seus estudos, eles observaram uma rápida deterioração da capacidade respiratória mitocondrial, ocorrendo em um período de apenas 2 horas após uma única administração de doxorubicina na dose de 20 mg/kg. Isso resultou em comprometimento do transporte de elétrons. Nesses experimentos, a respiração mitocondrial foi significativamente inibida, tanto nos substratos do complexo I (piruvato/glutamato) quanto do complexo II (succinato). Além disso, houve um aumento substancial na produção de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), cerca de 52%, pela cadeia respiratória mitocondrial no músculo esquelético (GILLIAM; FISHER-WELLMAN; LIN; MAPLES et al., 2013; GILLIAM; LARK; REESE; TORRES et al., 2016).

Outro estudo, conduzido por Min et al. (2015) confirmou que a administração de doxorubicina, especificamente uma única injeção com a dose de 20 mg/kg, por si só, resultou em uma redução significativa na capacidade respiratória mitocondrial e um aumento no desacoplamento e disfunção mitocondrial. Essas alterações foram observadas ao avaliar as fibras musculares permeabilizadas nos músculos diafragma, sóleo e plantar. Essa interrupção no fluxo de elétrons nas mitocôndrias é uma fonte potencial de produção de espécies reativas de oxigênio. (MIN; KWON; SMUDER; WIGGS et al., 2015).

O excesso de EROs contribui para atrofia do músculo esquelético, uma vez que ativa vias de proteolíticas e apoptóticas. Jang et al, em 2020 demonstrou que mesmo o estresse oxidativo leve aumenta a degradação de proteínas muscular, causando um aumento da expressão dos principais componentes da via ubiquitina proteassoma (UPS), como atrogina-1 e MuRF1, sendo um dos principais sistemas de degradação proteica (JANG; RODRIGUEZ; LUSTGARTEN; MULLER et al., 2020). Além disso, o estresse oxidativo pode ativar vias de sinalização intracelular, como a via NFκB, que está envolvida na regulação da expressão de genes relacionados à resposta ao estresse oxidativo e à degradação proteica. Estudos demonstram que a MuRF-1 pode ser ativada pelo NFκB (BONALDO; SANDRI, 2013; WU; CORNWELL; JACKMAN; KANDARIAN, 2014).

Desta forma, é importante destacar que a função mitocondrial desempenha um papel crucial na toxicidade induzida pela doxorubicina nos músculos esqueléticos, uma vez, que

induz a produção de EROs, podendo levar atrofia muscular através da ativação de via proteolíticas e apoptóticas.

### 1.2.3 Doxorrubicina e proteólise e apoptose no músculo esquelético

A via ubiquitina-proteossoma é um dos principais sistemas de degradação de proteínas nas células e desempenha um papel crucial na regulação do tamanho e da função celular. Proteínas envolvidas em processos de atrofia, como MuRF (*Muscle RING Finger*) e atrogina, são importantes na regulação da degradação de proteínas musculares, que é essencial para a manutenção do equilíbrio entre a síntese e a degradação de proteínas durante condições fisiológicas e patológicas.

Tanto a MuRF quanto a atrogina são E3 ligases de ubiquitina que têm sido amplamente estudadas em relação à atrofia muscular. A MuRF é expressa principalmente em tecido muscular e está envolvida na degradação seletiva de proteínas contráteis, como a troponina I cardíaca e a miomesina, resultando em atrofia muscular. Também demonstrado que Murf-1 se liga a proteína miofibrilar que prevê tensão passiva do músculo, a titina. Além disso, ela parece ter um papel na regulação do processo de turnover dessa proteína. Quando a interação entre MuRF1 e a titina é interrompida, como pode acontecer devido à inatividade, essa enzima marcadora de ubiquitina pode ser deslocada para o núcleo celular, onde inicia a ativação de genes envolvidos no programa de atrofia muscular (TOIGO; BOUTELLIER, 2006). Já a atrogina, também conhecida como MAFbx (*Muscle Atrophy F-box protein*) é responsável pela degradação de várias proteínas envolvidas na regulação do crescimento e da homeostase muscular, como a MyoD e MEF2 (fatores de transcrição relacionados ao músculo).

Um estudo conduzido por Kavazis et al. (2014) revelou um aumento nos níveis de gênicos de atrogina-1/MaFbx e MuRF-1 no músculo sóleo de animais sedentários após a administração de doxorrubicina (KAVAZIS; SMUDER; POWERS, 2014). Esses resultados estão em concordância com as descobertas de Hulmi et al. (2018), que demonstraram um aumento significativo no mRNA da ubiquitina ligase E3 atrogina-1 induzido pela Dox (HULMI; NISSINEN; RÄSÄNEN; DEGERMAN et al., 2018).

Além disso, a doxorrubicina induz a atrofia muscular ao aumentar a atividade das enzimas calpaína-1 e caspase-3 (SMUDER; KAVAZIS; MIN; POWERS, 2011a; b). Tanto a calpaína-1 quanto a caspase-3 são responsáveis por degradar proteínas miofibrilares intactas e

clivar proteínas estruturais do músculo esquelético, o que resulta na atrofia muscular. Ademais, o aumento na formação de EROs nas mitocôndrias, induzido pela doxorubicina, contribui para a proteólise por meio de alterações oxidativas que promovem a degradação de proteínas miofibrilares, como miosina, actina, troponina I e  $\alpha$ -actinina, pelas enzimas calpaína-1 e caspase-3 (SMUDER; KAVAZIS; MIN; POWERS, 2011a; b)

Estudos têm demonstrado que a doxorubicina causa danos ao DNA dentro dos núcleos das fibras musculares, levando à ativação da calpaína-1 e caspase-3, como evidenciado pelo aumento significativo do número de núcleos positivos para TUNEL (um marcador de apoptose) no tecido muscular esquelético (SMUDER; KAVAZIS; MIN; POWERS, 2011a; YU; PEI; SIN; YIP et al., 2014). A doxorubicina induz a apoptose, um processo de morte celular programada, no tecido muscular esquelético, e esse dano celular, aliado à atrofia muscular, contribui para a redução do número de células musculares e a disfunção muscular (YU; PEI; SIN; YIP et al., 2014). Portanto, a regulação positiva da atividade da calpaína-1 e caspase-3 pela doxorubicina desencadeia a degradação de proteínas musculares, resultando em apoptose das células musculares.

A proteólise mediada pela caspase-3 está associada aos processos de apoptose, sendo que o citocromo c desempenha um papel crucial nesse processo, liberando-se das mitocôndrias para o citoplasma em resposta a estímulos apoptóticos. No citoplasma, o citocromo c interage com a APAF-1, formando o apoptossoma, que ativa proteases, incluindo a caspase 3. A ativação da caspase 3 resulta na clivagem de proteínas celulares, levando à apoptose. Por fim, a desregulação do equilíbrio entre a síntese e degradação de proteínas é um mecanismo crucial na atrofia muscular, desempenhando um papel central nesse processo.

#### 1.2.4 Doxorubicina e autofagia no músculo esquelético

A autofagia é um processo biológico fundamental que descreve a capacidade das células de se autodigerirem e reciclarem componentes celulares danificados ou não essenciais. Esse processo é crucial para a manutenção da homeostase celular e tem implicações importantes para a saúde e o funcionamento do organismo como um todo. É altamente regulado que começa com a formação de uma estrutura membranosa chamada de autofagossomo. Essa membrana cresce e envolve os componentes celulares que precisam ser reciclados. Uma vez que o autofagossomo está completo, ele se funde com um lisossomo. Isso resulta na quebra dos componentes celulares dentro do autofagossomo, liberando nutrientes que podem ser usados em outros processos celulares. Portanto, a autofagia é um processo importante pois atua na eliminação de

organelas celulares danificadas, proteínas agregadas, ou patógenos intracelulares, ajudando a prevenir o acúmulo de lixo celular e a manter a integridade das células. (HIENSCH; BOLAM; MIJWEL; JENESON et al., 2020).

A autofagia é constitutivamente ativada em níveis basais nas células. No entanto, a atividade autofágica é regulada principalmente pelo estresse metabólico celular, como, por exemplo: a falta de nutrientes, hipóxia, danos ao DNA, presença de patógenos e doenças inflamatórias. Diante disso, pode desempenhar um papel de um mecanismo de sobrevivência adaptativa. No entanto, há uma compreensão de que a indução da autofagia pode, eventualmente, conduzir à morte celular por meio do processo de apoptose (JIAO; DEMONTIS, 2017).

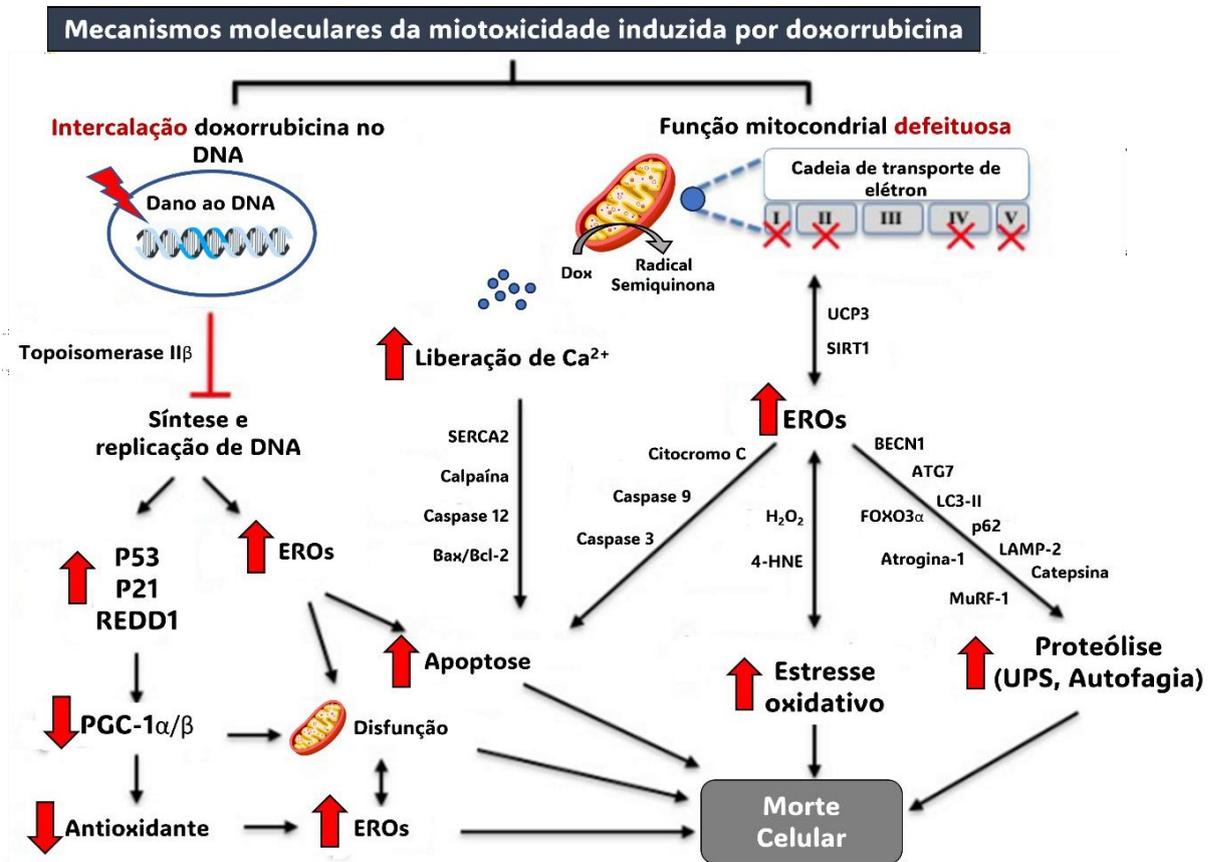
Resumidamente a autofagia envolve uma série de etapas coordenadas como: 1) iniciação e nucleação (recrutamento de moléculas para extensão da membrana de isolamento), 2) alongamento e fechamento do fagóforo (autofagossomo), 3) fusão com lisossomos (autolisossomos), 4) degradação e 5) citoplasmática reciclagem de materiais (12), sendo essas etapas reguladas por inúmeros genes e proteínas. (DWIVEDI; SONG; AHNN, 2009).

Focando na última etapa da autofagia, a fusão entre endossomos tardios e lisossomos, ela pode ser controlada pela proteína Rab7. As Rabs constituem uma família de proteínas de reconhecimento e endereçamento com função GTPase que, juntamente com outras proteínas, fazem parte do sistema de transporte e de reconhecimento de vesículas. A fusão entre endossomos tardios e lisossomos é fundamental para a entrega de conteúdos endocíticos aos lisossomos, onde ocorre a degradação e reciclagem de componentes celulares. Além do seu papel central na fusão endossomo-lisossomo, a RAB7 também desempenha funções em outras vias intracelulares, como a regulação da via de autofagia, o tráfego vesicular entre endossomos tardios e o retículo endoplasmático, e a manutenção da homeostase de íons.

Diversos estudos demonstraram que a autofagia é um dos mecanismos envolvidos na cardiotoxicidade induzida por doxorubicina (BARTLETT; TRIVEDI; PULINILKUNNIL, 2017; LI; GU; ZHANG; FENG et al., 2019; SMUDER; KAVAZIS; MIN; POWERS, 2013).

A cerca do músculo esquelético, um estudo conduzido por Smuder et al. (2011), demonstrou que durante a administração da doxorubicina os marcadores de autofagia aumentam significativamente, incluem aumento nos níveis gênicos e proteicos de Beclin-1, Atg12, níveis proteicos de Atg7 e níveis gênicos de LC3 e a razão de LC3II/LC3I, que são essenciais para a formação e maturação do autofagossomo (SMUDER; KAVAZIS; MIN; POWERS, 2011a).

Figura 2 – Mecanismos moleculares envolvidos na miotoxicidade induzida por doxorubicina



### 1.2.5 Doxorrubicina e prejuízo na síntese muscular

Além de seu potencial para ativar vias celulares envolvidas na degradação de proteínas, os dados também indicam que a doxorubicina é capaz de reduzir a síntese proteica.

A síntese muscular envolve várias proteínas cruciais, sendo a via Akt-mTOR-P70S6K uma cascata de sinalização central nesse processo. A ativação dessa via começa com a ativação da proteína Akt (também conhecida como proteína quinase B) em resposta a diversos estímulos, incluindo insulina e fatores de crescimento. A Akt ativa o complexo mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1), que desempenha um papel fundamental na regulação da síntese de proteínas e do crescimento celular, agindo como um sensor de nutrientes, especialmente aminoácidos (SCHIAFFINO; MAMMUCARI, 2011).

O mTORC1, quando ativado pela Akt, estimula a enzima P70S6K, que, por sua vez,

fosforila a proteína ribossomal S6, essencial na montagem dos ribossomos. Esse processo resulta em um aumento na síntese de proteínas, especialmente aquelas envolvidas no crescimento e adaptação do tecido muscular em resposta a estímulos anabólicos, como o exercício físico e outros fatores de crescimento (SCHIAFFINO; MAMMUCARI, 2011).

Um estudo que avaliou o músculo gastrocnêmio de camundongos, demonstrou que o tratamento de doxorubicina a uma dose de 15mg/Kg, reduziu a fosforilação da proteína Akt e ERK (Quinase regulada por sinal extracelular) (YU; PEI; SIN; YIP et al., 2014). Em concordância a esse achado, outro estudo revelou também que a doxorubicina inibe a fosforilação de Akt no músculo (NISSINEN; DEGERMAN; RÄSÄNEN; POIKONEN et al., 2016).

Além disso, evidências emergentes sugerem que a sinalização através do sistema renina-angiotensina (SRA) contribui para a atrofia do músculo esquelético em resposta a doenças crônicas (por exemplo, insuficiência cardíaca congestiva ou doença renal crônica (POWERS; MORTON; HYATT; HINKLEY, 2018).

#### 1.2.6 Participação do Sistema Renina-Angiotensina (SRA)

A relação entre o SRA e o músculo esquelético, em particular no contexto da doxorubicina, é um campo de estudo ainda em desenvolvimento. Todas as pesquisas sobre a relação entre o SRA e a doxorubicina têm se concentrado nos efeitos cardiovasculares e na cardiotoxicidade associada ao tratamento com esse medicamento (LEVIS; BINKLEY; SHAPIRO, 2017; MIN; KWON; SMUDER; WIGGS et al., 2015; SINGAL; ILISKOVIC,

1998; SWAIN; WHALEY; EWER, 2003). Como será discutido adiante, as evidências acerca de estratégias para minimizar o risco de cardiotoxicidade ainda são incipientes. Recentemente, a Sociedade Europeia de Cardiologia propôs o uso de inibidores do SRA [inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA) ou antagonistas de receptores de angiotensina do tipo 1] e betabloqueadores como uma das estratégias de prevenção primária para pacientes em risco alto ou muito alto de disfunção cardíaca associada ao tratamento oncológico (LYON; LÓPEZ- FERNÁNDEZ; COUCH; ASTEGGIANO et al., 2022). No entanto, as evidências ainda carecem de estudos de maior qualidade, randomizados, controlados e com duplo cego (GAO; WANG; JIANG; HU et al., 2023). Ainda, o papel da modulação do SRA nesse contexto, mesmo no coração, ainda não está claro. A utilização de inibidores do SRA foi pensada inicialmente uma vez que fazem parte da terapia padrão da insuficiência cardíaca com fração de ejeção reduzida crônica pelos seus efeitos contra o remodelamento cardíaco

adverso, assim como os betabloqueadores. Embora as evidências sejam controversas, o uso de inibidores do SRA durante e após o ciclo com quimioterápicos incluindo a doxorrubicina parece preservar a fração de ejeção ventricular esquerda (LEWINTER; NIELSEN; EDFORS; LINDE et al., 2022).

Estudos experimentais têm evidenciado que a doxorrubicina aumenta a expressão miocárdica do subtipo 1 do receptor de angiotensina (AT1r) (TOKO; OKA; ZOU; SAKAMOTO et al., 2002; ZONG; YANG; CHEN; HUANG et al., 2011), reduz a do subtipo (AT2r) e reduz os níveis circulantes de Ang (1-7) (ZONG; YANG; CHEN; HUANG et al., 2011).

Hoje sabe-se que o SRAA é composto por diferentes eixos de sinalização distintos rotulados como: 1) via clássica; e 2) via não clássica.

A renina, produzida pelas células justaglomerulares nos rins, atua sobre o angiotensinogênio, produzido no fígado, convertendo-o em angiotensina I, que posteriormente é transformada em angiotensina II (Ang II) pela enzima conversora de angiotensina (ECA), principalmente presente nos pulmões (FRANTZ; PRODEL; BRAZ; GIORI et al., 2018).

A ECA também desempenha um papel no sistema caliceína-cinina, degradando a bradicinina, um vasodilatador. O receptor B2 (B2R) da bradicinina é amplamente expresso em condições normais, mas o receptor B1 (B1R) é expresso em situações de inflamação e lesão. A Ang II é o principal hormônio da via clássica do SRAA e atua por meio dos receptores de angiotensina, especialmente os receptores do tipo 1 (AT1R) e do tipo 2 (AT2R), que têm papéis geralmente opostos (FRANTZ; PRODEL; BRAZ; GIORI et al., 2018).

A ativação do eixo clássico do SRA (ECA/Ang II/AT1R) estimula a ativação do sistema nervoso simpático, a produção do hormônio antidiurético (ADH), aumenta os níveis de aldosterona e de cálcio livre, promove vasoconstrição e aumento da pressão arterial. Ao mesmo tempo, a ativação do AT1R diminui o tônus do sistema nervoso parassimpático, a produção de óxido nítrico (NO) e a natriurese (eliminação de sódio pelos rins). Por outro lado, o AT2R, embora tenha afinidade similar com a Ang II, está associado a efeitos vasodilatadores, anti-inflamatórios e antioxidantes. A interação entre esses receptores regula os efeitos fisiológicos da Ang II (FRANTZ; PRODEL; BRAZ; GIORI et al., 2018).

O SRA possui um mecanismo contrarregulatório que equilibra seus efeitos, incluindo a ativação da via não clássica, envolvendo a angiotensina 1-7 (Ang1-7). Esta substância é produzida a partir da Ang II por diferentes reações enzimáticas e se liga ao receptor Mas, desencadeando efeitos benéficos, como a regulação da pressão arterial e proteção cardiovascular (FRANTZ; PRODEL; BRAZ; GIORI et al., 2018).

Devido aos efeitos positivos da Ang 1-7 na saúde cardiovascular e metabólica, ela é alvo de pesquisas para possíveis aplicações terapêuticas em condições como hipertensão, insuficiência cardíaca e aterosclerose. No entanto, são necessárias mais pesquisas para compreender completamente seu potencial terapêutico, possíveis efeitos colaterais e interações com outros componentes do SRAA (FRANTZ; PRODEL; BRAZ; GIORI et al., 2018).

A doxorubicina é conhecida por causar efeitos colaterais graves nos músculos esqueléticos, como fadiga, fraqueza muscular, dor muscular e miopatia (dano muscular). Acredita-se que parte dos danos musculares causados pela doxorubicina possa estar relacionada com aumento do estresse oxidativo como falado anteriormente.

Alguns mecanismos são propostos pelos quais o SRA pode afetar o músculo esquelético. Um componente chave na sinalização do receptor AT1R que contribui para a perda de massa muscular é a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS). O estresse oxidativo desempenha um papel significativo na promoção da atrofia do músculo esquelético, acelerando a degradação proteica e reduzindo a síntese de proteínas. A ativação do eixo SRA clássico estimula a produção de oxidantes, em parte devido à ativação do receptor AT1R, que por sua vez ativa predominantemente a isoforma NADPH oxidase no músculo esquelético (NOX2), levando à produção de radicais superóxido. Existe uma interação entre NOX2 e mitocôndrias, onde a ativação de NOX2 aumenta a geração de ROS nas mitocôndrias. Vários mecanismos podem explicar como a ativação de NOX2 aumenta a produção mitocondrial de ROS, incluindo a oxidação de proteínas nos complexos de transporte de elétrons, a diminuição da capacidade antioxidante da glutathiona mitocondrial e a liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático, levando a um aumento na produção de ROS mitocondrial (POWERS; MORTON; HYATT; HINKLEY, 2018).

Outro ponto importante, é que o eixo Ang II/AT1R ativa o NFκB de forma ROS-dependente, através da fosforilação e ubiquitinação do inibidor de κB (IκB) α (ZHOU; LIU; TIAN; NISHIYAMA et al., 2015). NFκB e seus genes-alvo desempenham um papel fundamental no aumento da inflamação, podendo afetar diretamente o músculo esquelético.

Além disso, estudos observaram que a infusão de Ang II pode induzir a ativação da caspase-3 e estimulação da proteína ubiquitina (BRINK; PRICE; CHRAST; BAILEY et al., 2001; SONG; LI; DU; MITCH et al., 2005).

Outro achado foi que a Ang II demonstrou diminuir a expressão de PGC-1α e do Fator de Transcrição Mitocondrial A (TFAM), que são cruciais para a biogênese mitocondrial (TABONY; YOSHIDA; SUKHANOV; DELAFONTAINE, 2014). Essas constatações sugerem

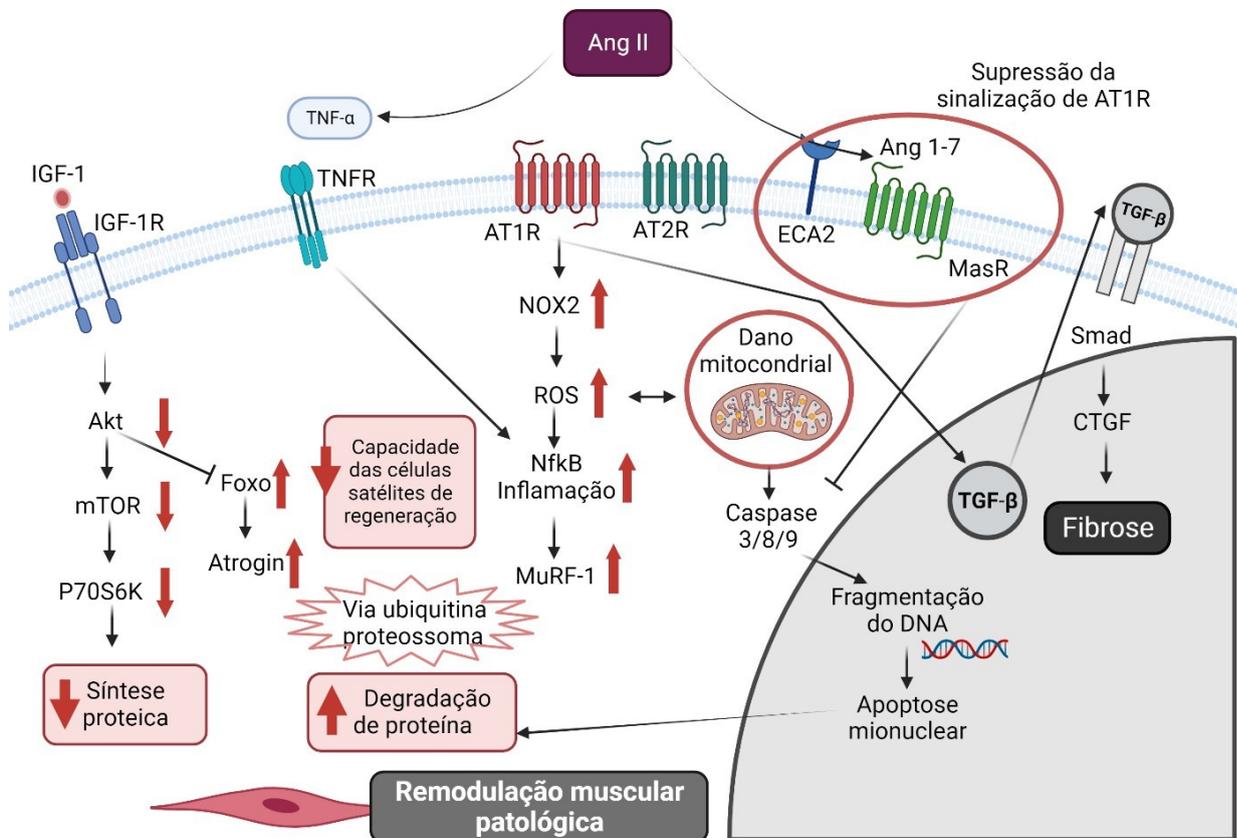
enfaticamente que a inibição da sinalização da Ang II representa um alvo promissor no tratamento à perda de massa muscular em contextos patológicos.

Embora a relação entre o SRA e o músculo esquelético durante o tratamento com doxorrubicina ainda precise ser mais bem compreendida, alguns estudos experimentais têm sugerido que inibidores do SRA, como inibidores da enzima conversora de angiotensina (IECA)(COIRAULT; HAGEGE; CHEMLA; FRATACCI et al., 2001; DALLA LIBERA;

RAVARA; ANGELINI; ROSSINI et al., 2001) e bloqueadores do receptor de angiotensina II (BRA) (KWON; SMUDER; WIGGS; HALL et al., 2015), podem ter um efeito protetor no músculo esquelético contra injúrias. Esses medicamentos podem reduzir a ativação do SRA, diminuindo assim o estresse oxidativo e a inflamação no músculo esquelético, o que pode ajudar a preservar a função e a saúde muscular durante o tratamento.

Outro ponto importante a ser abordado é que a ativação do eixo não clássico do SRA resulta na inibição direta da ativação de AT1R e seus efeitos. Por exemplo, ativação de AT1R resulta em aumentos celulares em MAPKs, em contraste, a ligação de Ang1-7 ao MasR resulta em uma atividade significativamente menor de ERK 1/2 e p38 e aumento da fosforilação da proteína Akt. Um estudo realizado com camundongos nocautes para ECA2 demonstrou que a Ang1-7/MasR parece ser fundamental para a hipertrofia muscular induzida por exercício, uma vez que os animais não mostraram aumento do diâmetro muscular após o exercício (MOTTA-SANTOS; DOS SANTOS; OLIVEIRA; QADRI et al., 2016). Outros estudos apontaram que o eixo Ang1-7/MasR diminui a atrofia do músculo esquelético induzida por AngII, diminuindo os níveis de atrogin-1 e MuRF-1 (CISTERNAS; MORALES; MENESES; SIMON et al., 2015) (MENESES; MORALES; ABRIGO; SIMON et al., 2015). Além disso, a ativação do MasR também pode impedir a ativação da NADPH oxidase mediada por AT1R. Destaca-se assim, um potencial terapêutico benéfico da ativação da via não clássica do SRA para se opor aos efeitos prejudiciais da ativação do AT1R na saúde do músculo esquelético.

Figura 3 – Eixo ECA-Ang (1-7)-MasR contrarregulatório as ações deletérias do eixo ECA/Ang II/AT1R no desenvolvimento do remodelamento muscular patológico



Fonte: Adaptado de YAMAMOTO et. al, 2020.

No entanto, é importante ressaltar que mais pesquisas são necessárias para entender completamente a relação entre o SRA e o músculo esquelético durante o tratamento com doxorubicina.

### 1.3 Estratégias para atenuar os efeitos adversos

A quantidade de indivíduos que sobrevivem ao câncer está em constante crescimento, e é previsto que esse número dobre nas próximas décadas. Embora os tratamentos tenham se tornado cada vez mais eficazes, os sobreviventes de câncer ainda enfrentam desafios singulares pelos efeitos da doença e pela utilização dos quimioterápicos. Esses efeitos incluem declínios na capacidade física, qualidade de vida e riscos aumentados de recorrência da doença e mortalidade por todas as causas, quando comparados a pessoas sem histórico de câncer. Dessa forma, estratégias vêm sendo estudadas para minimizar os efeitos tóxicos da doxorubicina, como o uso de antioxidantes, derivados lipossomais, preparações de antraciclina modificadas e outras

classes de fármacos. No entanto, apesar de serem promissores em modelo experimental, os ensaios clínicos controlados apresentam resultados divergentes com grande parte não tendo sido utilizado na prática clínica (MCGOWAN; CHUNG; MAULIK; PIOTROWSKA *et al.*, 2017).

Em 2010, o American College of Sports Medicine publicou um dos primeiros documentos que relatava a eficácia e segurança da prática de exercício físico como uma intervenção não farmacológica e não invasiva para sobreviventes do câncer (HAYWARD; HYDOCK, 2007). Diversos estudos têm demonstrado o efeito do treinamento físico na toxicidade induzida pela doxorrubicina, em especial o treinamento aeróbico, que se mostrou eficaz em reduzir a cardiotoxicidade, incluindo pesquisas conduzidas por nosso próprio grupo (MATSUURA; BRUNINI; CARVALHO; RESENDE *et al.*, 2010; SEQUEIRA; MARTINS;

ALVES; NASCIMENTO *et al.*, 2021). Mecanismos subjacentes a essa proteção ainda não são completamente compreendidos, mas evidências apontam para as alterações promovidas pelo exercício na composição corporal, nos níveis hormonais, na redução da inflamação sistêmica e na melhoria da função celular imunológica como possíveis responsáveis por esse efeito terapêutico (IDORN; THOR STRATEN, 2017). O potencial do exercício físico em prevenir ou reduzir a toxicidade causada por agentes quimioterápicos é uma área de pesquisa em crescimento, apresentando resultados promissores em estudos pré-clínicos (CHEN; WU; MIDDLEKAUFF; NGUYEN, 2017). Recentemente, uma revisão sistemática com meta-análise demonstrou que várias intervenções baseadas em exercícios são capazes de proteger contra a cardiotoxicidade induzida pela doxorrubicina em modelos animais, sendo a redução da acumulação de doxorrubicina no miocárdio um dos possíveis mecanismos envolvidos (NAAKTGEBOREN; BINYAM; STUIVER; AARONSON *et al.*, 2021). É relevante destacar que essa proteção ocorre sem comprometer a eficácia antitumoral. Vale mencionar que a maioria dos estudos incluídos nessas investigações empregou o treinamento aeróbico como forma de exercício.

Sabe-se que o treinamento de força ou treinamento resistido é uma intervenção eficaz para atenuar a perda de função muscular. Os principais benefícios do treinamento de força incluem: aumento da massa e força muscular, melhoria da função metabólica e da mobilidade e equilíbrio, prevenção de doenças crônicas, promoção da saúde óssea e melhoria da qualidade de vida.

Desta forma, torna-se importante estudar os efeitos do treinamento resistido (TR) no contexto de utilização de drogas como a doxorrubicina, uma vez que este medicamento mostrou acarretar toxicidade no músculo esquelético, induzindo perda da massa e função muscular.

### 1.3.1 Treinamento resistido

O treinamento resistido tem sido objeto de interesse científico desde o século XX, com o American College of Sports Medicine (ACSM) destacando seus benefícios em 1998. Em 2009, o ACSM publicou o documento intitulado "*Progression models of resistance training for healthy adults*", que abordou os princípios fundamentais para a progressão do treinamento: sobrecarga, especificidade e variação. Esse tipo de treinamento envolve a contração voluntária da musculatura esquelética contra resistência, que pode ser do próprio corpo, pesos livres ou máquinas.

Modelos experimentais em roedores foram desenvolvidos para simular atividades humanas e compreender os efeitos fisiológicos do exercício. O TR em roedores busca melhorar força, potência e resistência muscular, variando a intensidade, séries, repetições e intervalos de recuperação.

A aplicação de TR em roedores pode ser desafiadora, uma vez que parte dos animais não adere facilmente ao exercício voluntário. Portanto, equipamentos específicos e estímulos (como choques elétricos) são empregados para induzir os animais a realizar o exercício. Diversos modelos de TR são utilizados, tais como levantamento de peso, treinamento com alavancas, estimulação elétrica em animais inconscientes e a subida em escada (SEO; LEE; KIM; KO *et al.*, 2014).

Neste contexto, o modelo experimental de TR escolhido nesta tese é o de subida em escada, amplamente empregado na pesquisa (SANCHES; CONTI; SARTORI; IRIGOYEN *et al.*, 2013; SHIGUEMOTO; PRESTES; LEITE; PEREIRA *et al.*, 2012) Nesse modelo, ratos são treinados para subir uma escada especialmente projetada com 54 degraus. Inicialmente, os animais são familiarizados com a atividade, e então a intensidade (expressa como percentual da carga máxima ligada à cauda) e o volume (número de repetições) do treinamento são gradualmente aumentados. Essa atividade caracteriza-se como exercício resistido, contribuindo para a hipertrofia muscular das fibras dos músculos gastrocnêmio, sóleo, flexor longo dos dedos e plantar (CASSILHAS; LEE; VENÂNCIO; OLIVEIRA *et al.*, 2012).

As vantagens desse modelo de TR incluem semelhanças significativas com o TR

progressivo em humanos, menor estresse após a fase de familiarização, prática voluntária sem estímulos aversivos (como choques elétricos) para manter o desempenho e a ausência de restrição de alimento e água (SEO; LEE; KIM; KO *et al.*, 2014).

Até nosso conhecimento, apenas dois estudos avaliaram os efeitos do TR no músculo esquelético após tratamento com a doxorrubicina. Boa parte dos estudos que avaliaram o músculo esquelético no contexto da doxorrubicina realizaram treinamento com exercício de Endurance.

Os estudos sugerem um efeito cardioprotetor do TR (Tabela 1) e, com o presente estudo, pretendemos ampliar o entendimento dos seus efeitos da doxorrubicina sobre o músculo esquelético.

Tabela 1 – Estudos que avaliaram o efeito do treinamento resistido em músculos esqueléticos após tratamento com a doxorrubicina

<b>Referência</b>	<b>Amostra</b>	<b>Tipo do exercício</b>	<b>Efeito do TR no músculo esquelético</b>
Brendahl et al. 2016	Ratos Sóleo e EDL	TR	O TR manteve a força máxima de contração e a taxa máxima de declínio de força no sóleo
Brendahl et al. 2020	Ratos Sóleo e EDL	TR	O TR atrasou a fadiga induzida pela Dox em 20s no sóleo e 10s no EDL; O TR e creatina combinados retardaram a fadiga induzida pela Dox em 50s no sóleo e 20s no EDL

Legenda: EDL- extensor digital longo; TR – treinamento resistido; s -segundos.

#### 1.4 **Justificativa**

O número de indivíduos que sobrevivem ao câncer está em constante crescimento, e estima-se que esse número dobre nas próximas décadas. Apesar dos avanços nos tratamentos que se tornaram mais eficazes, os sobreviventes de câncer ainda enfrentam desafios significativos devido aos efeitos colaterais do tratamento com quimioterápicos. Entre eles, a doxorubicina é amplamente conhecida por seu efeito cardiotoxico em adultos e crianças, limitando seu uso. Além disso, essa droga pode causar danos em outros órgãos, como músculo esquelético, fígado e rins, resultando em problemas adicionais. Atualmente, não existem estratégias terapêuticas completamente eficazes para prevenir as alterações deletérias causadas diretamente pela doxorubicina. Nesse contexto, é crucial buscar novas abordagens que ajudem a minimizar os efeitos adversos associados a terapias extremamente agressivas, a fim de reduzir a morbidade e mortalidade do indivíduo. O presente estudo tem como objetivo fortalecer o papel do treinamento resistido no tratamento com a doxorubicina. Através desse tipo de treinamento, pretende-se mitigar os efeitos tóxicos do uso dessa droga no músculo esquelético e melhorar a qualidade de vida do indivíduo. Ao avançarmos nessa linha de pesquisa, esperamos fornecer uma contribuição valiosa para a área da oncologia, ao oferecer uma abordagem complementar e promissora que possa ser integrada aos protocolos de tratamento.

## 2. OBJETIVO

### 2.1 Objetivo geral

Verificar o impacto do TR sobre os músculos esqueléticos de ratos tratados com doxorubicina e verificar se as possíveis alterações diferem entre os diferentes tipos de fibras musculares.

### 2.2 Objetivos específicos

Este estudo teve como objetivos específicos:

- a) avaliar a estrutura e ultraestrutura dos músculos esqueléticos de ratos tratados com doxorubicina e as alterações morfológicas induzidas pelo TR.
- b) investigar os efeitos da doxorubicina e do TR no estresse oxidativo;
- c) investigar os efeitos da doxorubicina e do TR no balanço proteico muscular;
- d) investigar os efeitos da doxorubicina e do TR na via do SRA.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Ética na pesquisa

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (IBRAG) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ) sob inscrição nº 23/2015 (ANEXO A). O estudo foi realizado de acordo com o “Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório” (National Institute of Health, 8th ed, US).

#### 3.2 Animais

Foram utilizados 42 ratos machos (*Rattus norvegicus*), da linhagem *Sprague Dawley*, com idade inicial de 8 semanas de vida e peso compreendido entre 270 – 300g, obtidos e mantidos pelo Biotério do Departamento de Farmacologia e Psicobiologia, localizado no IBRAG/UERJ.

Os animais foram mantidos em rack ventilado (Ventilife<sup>®</sup>, Alesco, Brasil), com até 4 animais em cada gaiola, sob as mesmas condições de temperatura (~23° C), umidade (60 ± 10 %), ruído, ciclo de luminosidade de 12 horas (luzes acesas às 6 horas e terminando às 18 horas) e livre acesso à água potável e ração industrializada específica para roedores (Nuvilab CR-1<sup>®</sup>, Quimtia, Brasil) durante todo o protocolo experimental.

##### 3.2.1 Grupos experimentais

Os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos experimentais, sendo:

- a) Controle (n=10): animais que receberam infusão intraperitoneal de solução salina;
- b) Dox/Sed (n=16): animais que receberam infusão intraperitoneal de Doxorubicina e permaneceram sedentários;

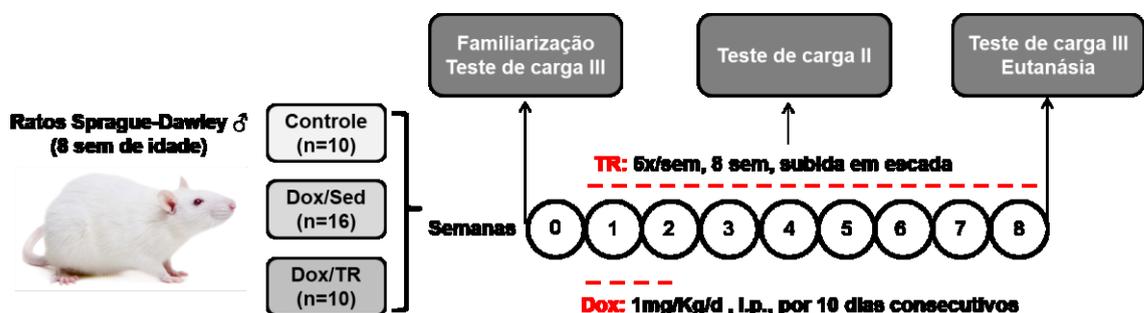
c) Dox/TR (n=16): animais que receberam infusão intraperitoneal de doxorubicina e realizaram TR (descrito a seguir).

Os grupos tratados com a doxorubicina tiveram uma amostra maior considerando a mortalidade esperada de aproximadamente 30% (HAYWARD; HYDOCK, 2007). Antes do início do protocolo experimental, os animais passaram por períodos de adaptação na escada.

### 3.3 Administração da doxorubicina e solução salina

O cloridrato de Dox (Adriplastina<sup>®</sup>, Pfizer, Brasil) foi administrado por infusão intraperitoneal, diariamente, durante 10 dias consecutivos, em dose de 1 mg/kg (dose total: 10 mg/kg). Os animais do grupo controle receberam solução salina (NaCl, 0,9%) em paralelo, de acordo com o mesmo protocolo (Hayward e Hydock, 2007). A escolha do protocolo de administração foi determinada com base no estudo de Hayward e Hydock (2007) que compararam três protocolos e observaram que todos levaram ao desenvolvimento de cardiomiopatia, mas que, quando feito na dose de 1 mg/kg por 10 dias, a sobrevivência dos animais foi maior, o que possibilitaria a realização do treinamento. A representação esquemática de todo protocolo experimental pode ser visualizada na figura 4.

Figura 4 – Representação esquemática do protocolo experimental



Legenda: Sem, semana; Dox: doxorubicina; TR: treinamento resistido; Sed: sedentário.  
Fonte: A Autora, 2023.

### 3.4 Treinamento resistido

O treinamento resistido foi realizado em modelo de subida em escada vertical (*ladder climbing*) que consistiu em escalar uma escada vertical (altura: 108 cm; largura: 21 cm; nº de degraus: 53; distância entre os degraus: 2 cm) com pesos atrelados às suas caudas (Figura 5). O aparato de carga (tubo falcon) foi preso na porção proximal da cauda com auxílio de uma linha.

#### 3.4.1 Familiarização do exercício

Na semana anterior ao início do protocolo experimental, os animais foram adaptados ao treinamento. A adaptação foi realizada gradualmente ao longo de cinco dias. Os animais foram introduzidos à escada, colocados nos degraus, até que os mesmos, voluntariamente subissem até o topo. Quando isso era conseguido (normalmente nos dias 2 ou 3), o aparato de carga era preso à sua cauda com uma linha. Nas sessões subseqüente, os animais escalaram três vezes a escada, com um intervalo passivo de 1 minuto entre cada subida. O aparato utilizado no treinamento resistido é demonstrado na Figura 5.

Figura 5 – Aparato para o treinamento resistido



Fonte: A autora, 2023.

### 3.4.2 Determinação da carga máxima

A carga máxima foi determinada como aquela em que o animal foi capaz de escalar a escada completa apenas uma vez. O teste foi iniciado com um aquecimento que consistiu de uma subida completa sem sobrecarga. Após 2 minutos de recuperação, a primeira tentativa foi realizada com carga de 75% da massa corporal. Em seguida, cada tentativa subsequente teve um acréscimo de 15% em relação à carga anterior, até que o animal não pudesse mais alcançar o topo da escada após estímulos sucessivos na cauda. Entre cada tentativa houve um intervalo de 2 minutos de recuperação. Foram permitidas no máximo 6 tentativas de escalada. Esse procedimento foi realizado na primeira semana (teste Basal), na quarta semana (teste Intermediário) e na oitava semana (teste Final).

### 3.4.3 Sessões de treinamento resistido

As sessões de treinamento resistido consistiam de 15 escaladas com 20 a 60% da carga máxima (determinada pelo Teste de Carga Máxima, descrito em 3.4.2.) e intervalo de 60 segundos entre as tentativas. A cada semana foram realizados ajustes no volume e intensidade de treinamento conforme relatado por Sanches et al. (2014). Essas sessões ocorreram 5 vezes na semana (segunda à sexta-feira), durante 8 semanas consecutivas (totalizando 40 sessões). Apenas os animais do grupo Dox/TR foram submetidos ao treinamento resistido, mas os animais dos demais grupos realizaram duas sessões de três subidas completas sem carga na semana anterior ao teste Intermediário e Final.

Tabela 2 – Tabela de descrição do treinamento resistido

1ª semana		2ª semana		3ª semana		4ª semana		5ª semana		6ª semana		7ª semana		8ª semana	
Nº de subidas*	% da CM														
2	0	1	0	2	0	1	0	1	0	1	0	2	0	1	0
3	20	1	20	1	20	1	20	1	20	1	30	2	40	2	40
2	30	4	30	2	30	1	30	2	30	2	40	3	50	4	50
2	40	3	40	2	40	2	40	2	40	3	50	3	60	5	60
2	30	4	30	1	50	2	50	3	50	2	60	3	50	2	50
2	20	1	20	2	40	2	40	2	40	3	50	1	40	1	40
2	0	1	0	2	30	2	30	2	30	1	40	1	0	1	0
				1	20	1	20	1	20	1	30				
				2	0	1	0	1	0	1	0				

Legenda: CM, carga máxima; (\*) 1 min de intervalo entre as tentativas.

Fonte: SANCHES et al., 2014.

### 3.5 **Massa corporal e ingestão alimentar**

A massa corporal foi aferida semanalmente em balança digital de precisão 0,1 g (Mark S ®, Bel Engineering, Itália). A ingestão alimentar média dos animais (g), representada pela diferença entre o que foi ofertado e o que sobrou da gaiola após 48-72 h, foi aferida a cada 2-3 dias.

### 3.6 **Eutanásia e isolamento de órgãos**

Ao final da oitava semana do protocolo experimental e 48 h após o teste de carga máxima final, os animais foram anestesiados com uma superdose de tiopental sódico (40 mg/kg) via intraperitoneal e o sangue foi coletado pela artéria aorta abdominal em tubos heparinizados. A eutanásia dos animais ocorreu por exsanguinação. Em seguida, os músculos esqueléticos (sóleo e gastrocnêmio) foram cuidadosamente dissecados e pesados. Parte do tecido foi imediatamente processada para microscopia óptica e eletrônica (descrito a seguir). A outra parte do tecido foi congelada instantaneamente em nitrogênio líquido e armazenados à - 80° C para medida da atividade enzimática antioxidante, ensaios pró-oxidantes e Western Blotting (descritos a seguir).

### 3.7 **Análises histológicas**

#### 3.7.1 Microscopia de luz

Fragmentos dos músculos esqueléticos foram isolados, limpos e imediatamente fixados em paraformaldeído a 4%. Os cortes histológicos (4 µm) foram corados com hematoxilina e eosina (HE) para medir a área de seção transversa dos miócitos. Para as análises, amostras de 5 animais foram analisadas, sendo 5 campos de cada animal capturadas com objetiva de 20x, de forma aleatória. Dessas imagens foram selecionadas aleatoriamente 10 áreas de secção transversa dos miócitos, analisando-se assim, as médias entre os grupos. As imagens foram coletadas com o auxílio de um microscópio óptico (Olympus). As imagens foram analisadas

pelo software de análise de Image-Pro Plus.

### 3.7.2 Microscopia eletrônica

Fragmentos dos músculos esqueléticos foram fixados em solução contendo 2,5% de glutaraldeído (Riedel-de-Haen, Alemanha) em tampão cacodilato 0,1M (pH 7,2) e 0,25% de ácido tânico (Merck). Após a fixação, as amostras foram lavadas três vezes, por 15 minutos em 0,1 M de tampão imidazol (pH 7,5) e foram pós-fixados em tetróxido de ósmio a 1% (Sigma), 0,8% de ferrocianeto de potássio em tampão cacodilato 0,1 M (pH 7,2) durante uma hora, e posteriormente, desidratados em acetona e incluídos em Epon (Embed-812). Cortes semifinos de um micrômetro (1  $\mu\text{m}$ ) de espessura foram corados com azul de toluidina e observados sob microscopia de luz para selecionar as áreas de interesse e posteriormente, realizar cortes ultrafinos no ultramicrotomo (Leica Ultracut). Os cortes ultrafinos foram contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo e observados no microscópio eletrônico de transmissão Jeol 1200EX (JEOL, EUA) em 80 kV.

## 3.8 **Biomarcadores de estresse oxidativo**

Para os ensaios de biomarcadores de estresse oxidativo, fragmentos do músculo gastrocnêmio foram homogeneizados em tampão PBS (100 mg tecido para 1 mL de tampão). O homogenato resultante foi centrifugado a 13.000 rpm a 4°C por 10 min e o sobrenadante foi armazenado. A dosagem de proteínas foi determinada usando ensaio colorimétrico pelo método do ácido bicinonínico (kit Pierce<sup>TM</sup> BCA Protein Assay, Thermo Fisher Scientific, EUA) com a leitura sendo realizada a 540 nm.

### 3.8.1 Atividade da enzima catalase

Foram utilizados 60  $\mu\text{L}$  de homogenato do músculo gastrocnêmio em cubetas de quartzo. Em cada cubeta, foram adicionados 1940  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato salino (PBS) com

peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), sendo 25 mL de PBS para 40 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A CAT é uma hemoproteína que catalisa a degradação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Na reação, uma das moléculas do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é oxidada e a outra é reduzida, formando oxigênio molecular e água, respectivamente. A leitura foi realizada nos tempos de 0, 30 e 60 segundos, numa absorvância de 240 nm (Genesys™10S UV-Vis Spectrophotometer, ThermoFisher Scientific, EUA).

### 3.8.2 Atividade da enzima glutathiona peroxidase

Foram adicionados a uma cubeta 200 µL da suspensão de homogenato do músculo gastrocnêmio e 1800 µL de PBS que continha glutathiona reduzida (GSH), glutathiona redutase (GR) e azida sódica, sendo 20 mL de tampão para 4 mL de GSH + 4 mL de GR + 1 mL de azida sódica. A amostra ficou incubada nesse tampão por 10 minutos. Após o tempo de incubação, NADPH (10 mM) foi adicionado ao meio e foram realizadas as leituras em um intervalo de cento e oitenta segundos. Posteriormente, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3%) foi adicionado e uma nova leitura foi realizada por duzentos e quarenta segundos. A determinação da atividade da GPx foi realizada a partir da taxa de decaimento da NADPH, determinada por espectrofotômetro, no comprimento de onda de 340 nm (Genesys™10S UV-Vis Spectrophotometer, ThermoFisher Scientific, EUA).

#### Avaliação da peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica foi avaliada através da formação de substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Foram utilizados 200 µL de homogenato do músculo gastrocnêmio em duplicata, os quais foram misturados com ácido tricloroacético a 10%, em seguida as amostras foram centrifugadas e incubadas com ácido tiobarbitúrico 0,67% por 30 minutos a 95°C. As amostras foram colocadas em microplacas e a leitura realizada a 532nm.

#### Avaliação da carbonilação de proteínas

Foram utilizados 100 µL de homogenato do músculo gastrocnêmio em duplicata. Foi

realizada uma lavagem com solução de HCl-Acetona, TCA 10%. Na lavagem, as amostras foram centrifugadas por 2 min a 2000 g e o sobrenadante foi descartado. Uma parte das amostras foi incubada com 2,4-dinitrofenilhidrazina e outra parte incubada com HCl 2M por 10 minutos. Em seguida, as amostras foram novamente centrifugadas e o sobrenadante descartado. Todas as amostras foram incubadas com guanidina 6M a 60°C por 30 minutos. As amostras foram centrifugadas e foi realizada a leitura da absorbância do sobrenadante por espectrofotômetro a 370 nm Genesys™10S UV-Vis Spectrophotometer, ThermoFisher Scientific, EUA).

Este método é utilizado para dosagem de oxidação de proteínas que se baseia no princípio de que vários radicais livres atacam resíduos de proteínas como aminoácidos(histidina, arginina, lisina e prolina) para produzir produtos com o grupo carbonila, o qual pode ser medido através da reação com 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH). A DNPH reage com proteínas carboniladas, formando uma base para produzir a hidrazona correspondente.

### 3.9 Expressão proteica por *Western Blotting*

Amostras dos músculos esqueléticos (sóleo e gastrocnêmio) (100 mg de cada músculos) foram homogeneizadas utilizando 1000 µL de tampão RIPA com os inibidores de proteases (10 µL) e fosfatase (10µL) (Sigma, EUA). Em seguida, as amostras foram centrifugadas (13000 rpm, 4°C, 15 minutos), o sobrenadante foi separado e as proteínas foram dosadas utilizando o kit BCA. Após esse processo, foram aplicadas 30 µg de amostra dos músculos esqueléticos nos poços de gel a 12% de poliacrilamida para eletro-separação de acordo com o tamanho e carga da proteína. Foram fracionadas por eletroforese (150 V, 200 mA, 60 min) em gel Stain Free™ 12% (Bio-Rad, CA, EUA), utilizando-se tampão de corrida Tris/glicina/SDS, e transferidas (15 V, 328 mA, 45 min) para membranas de PVDF (Invitrogen, Califórnia, EUA) em tampão de transferência (48 mM Tris, 39 mM Glicina). Para inibir ligações inespecíficas do anticorpo, as membranas foram incubadas em Tween 20 + tris-buffered saline (T-TBS) acrescido de albumina a 3% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) por 90 minutos. Posteriormente, as membranas foram lavadas com T-TBS e incubadas com os anticorpos primários para cada proteína (overnight, a 4°C). Os anticorpos utilizados são apresentados na Tabela 3.

Após este período de incubação, utilizamos um anticorpo secundário específico para cada anticorpo primário. As membranas foram novamente lavadas com T-TBS e a detecção das

bandas foi feita por quimioluminescência (Clarity Max, BioRad Inc., EUA) no sistema ChrmIDoc XRS+ (BioRad Inc., EUA). O controle de quantidade de proteínas na amostra foi feito pela correção pela intensidade das bandas do gel *Stain Free*<sup>TM</sup>, que foi revelado por exposição ultravioleta no aparelho ChemiDoc XRS+ (BioRad Inc. EUA). O padrão de peso molecular utilizado foi o Full-Range Rainbow<sup>TM</sup> Molecular Weight Marker (GE Healthcare, EUA). As bandas foram analisadas quantitativamente por densitometria pelo software ImageJ, versão 1.44 (NIH, [imagej.nih.gov/ij](http://imagej.nih.gov/ij), EUA).

Tabela 3 – Anticorpos utilizados nos ensaios de *Western Blotting*

Anticorpo	Diluição	Origem	Peso molecular	Código
Akt	1:1000	Cabra	62kDa	sc-1618
AT1R	1:500	Coelho	43kDa	sc-579
Atrogin-1	1:1000	Coelho	27 kDa	PAF435Hu01
B1R	1:1000	Coelho	35kDa	sc-25484
B2R	1:1000	Coelho	75-80kDa	sc-25671
Caspase 3	1:1000	Cabra	17kDa	sc-22140
Citocromo C	1:1000	Camundongo	15kDa	sc-13156
ECA	1:500	Coelho	167kDa	Ab11734
ECA2	1:500	Coelho	90kDa	Ab108252
IL-6	1:500	Cabra	21kDa	sc-1265
MasR	1:500	Camundongo	37kDa	sc-390453
MuRF-1	1:1000	Coelho	40 kDa	FNab08992
PGC1 $\alpha$	1:500	Coelho	90kDa	sc-13067
p-Akt	1:1000	Coelho	56-60kDa	sc-33437
pNF $\kappa$ B	1:500	Coelho	50kDa	sc-101746
p-p70 S6K	1:1000	Cabra	70kDa	sc-11759
Rab7	1:1000	Camundongo	22kDa	sc-271608
TNF- $\alpha$	1:1000	Camundongo	26kDa	sc-52746

### 3.10 Análise dos dados

Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). A normalidade dos dados foi confirmada através do teste de Shapiro Wilk. A diferença nas curvas

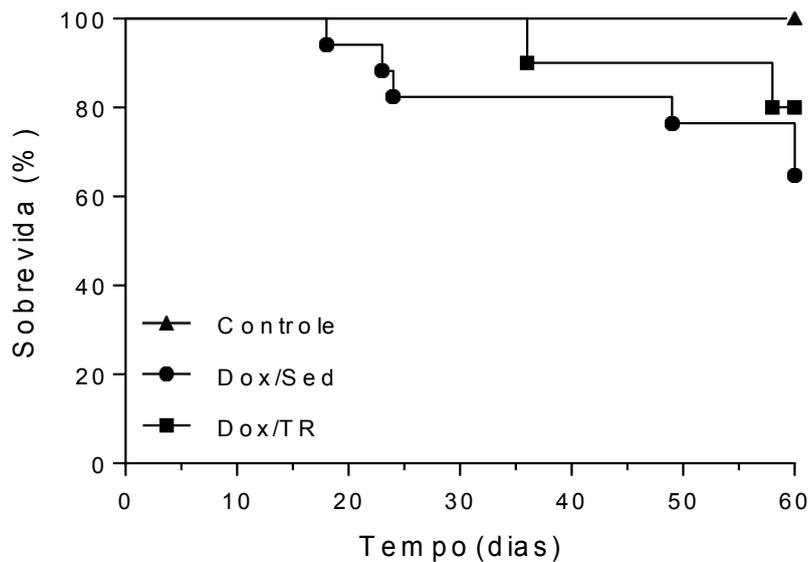
de sobrevida entre os grupos foi testada pelo teste Log-rank. Os dados do teste de carga máxima e resto ingestão foram comparados utilizando ANOVA de duas entradas com medidas repetidas, caso as premissas para a realização do teste sejam atendidas. Para as demais análises, a comparação foi realizada pela ANOVA de uma entrada. Em caso de F significativo, foi utilizado o pós-teste de Holm-Sidak. O nível de significância estabelecido foi de 5%. As análises dos dados e o preparo dos gráficos foram realizados utilizando o programa estatístico GraphPad Prism® versão 8 (GraphPad Inc., San Diego, CA, EUA).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Sobrevida

Um achado importante do presente estudo foi que o treinamento resistido regular atenuou a mortalidade dos animais tratados com doxorrubicina. Os resultados demonstram que houve uma elevada e precoce mortalidade dos animais do grupo Dox/Sed (38%), enquanto no grupo Dox/TR 80% dos animais sobreviveram durante o período experimental de oito semanas (Figura 6). Além disso, os animais que sobreviveram do grupo Dox/Sed apresentaram um estado geral de saúde ruim, com olhos claros, cromodaciorreia e cabelo duro.

Figura 6 – Curva de sobrevida.



Legenda: Dox: doxorrubicina; Sed: sedentário; TR: treinamento resistido. n=10-16 por grupo Nota: A sobrevida foi comparada pelo teste Log rank.

Fonte: A Autora, 2023.

### 4.2 Massa corporal e massa do músculo sóleo e gastrocnêmio

Em relação à massa corporal inicial dos animais não houve diferença significativa entre os grupos. Ao final do protocolo experimental, os animais do grupo Dox/Sed e Dox/TR apresentaram menor massa corporal comparado ao grupo Controle (-17%,  $P \leq 0,01$  and -9.2%,  $P$

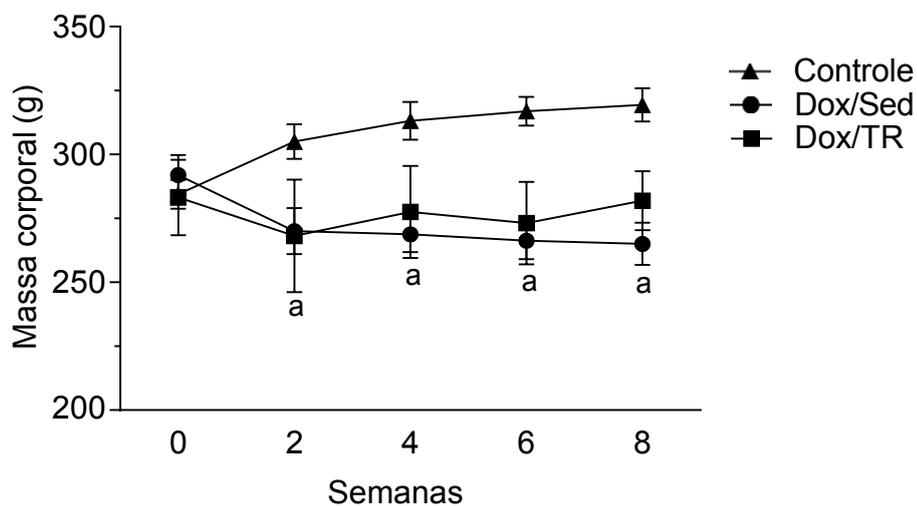
$\leq 0,05$ , respectivamente). Em adição, o TR em escada preveniu a perda de peso em 9,4% comparado ao grupo Dox/Sed ( $P \leq 0,05$ ). Além disso, os animais do grupo Dox/Sed apresentou uma massa do músculo sóleo inferior comparado aos animais Controle (-22%,  $P \leq 0,01$ ) ao final do protocolo experimental, mas não diferem do grupo Dox/TR. Em rela o   massa do músculo gastrocnêmio não foi observado diferença significativa (Tabela 4). A Figura 6 ilustra o comportamento da massa corporal durante o período experimental.

Tabela 4 – Massa corporal e massa dos músculos esqueléticos

	Controle	Dox/Sed	Dox/TR
<b>MC inicial (g)</b>	284,40 $\pm$ 5,62	291,90 $\pm$ 7,96	293,60 $\pm$ 12,04
<b>MC final (g)</b>	319,40 $\pm$ 6,51	265,00 $\pm$ 8,29 <sup>a</sup>	290,00 $\pm$ 9,51 <sup>a,b</sup>
<b>Massa sóleo (mg)</b>	220,60 $\pm$ 9,82	172,10 $\pm$ 7,71 <sup>a</sup>	198,00 $\pm$ 0,01
<b>Massa gastrocnêmio (g)</b>	2,14 $\pm$ 0,17	1,93 $\pm$ 0,10	1,85 $\pm$ 0,09

MC: Massa Corporal; Dox: doxorubicina; Sed: sedentário; TR: treinamento resistido. n=10-16 por grupo. Dados são apresentados como média  $\pm$  EPM. <sup>a</sup> $P < 0,05$  vs. Controle; <sup>b</sup> $P < 0,05$  vs. Dox/Sed. Fonte: A Autora, 2023.

Figura 7 – Acompanhamento da massa corporal ao longo do protocolo experimental



Legenda: Dox, doxorubicina; Sed, sedentário; TR, treinamento resistido (N=10-16). <sup>a</sup> $P < 0,05$  vs. Controle.

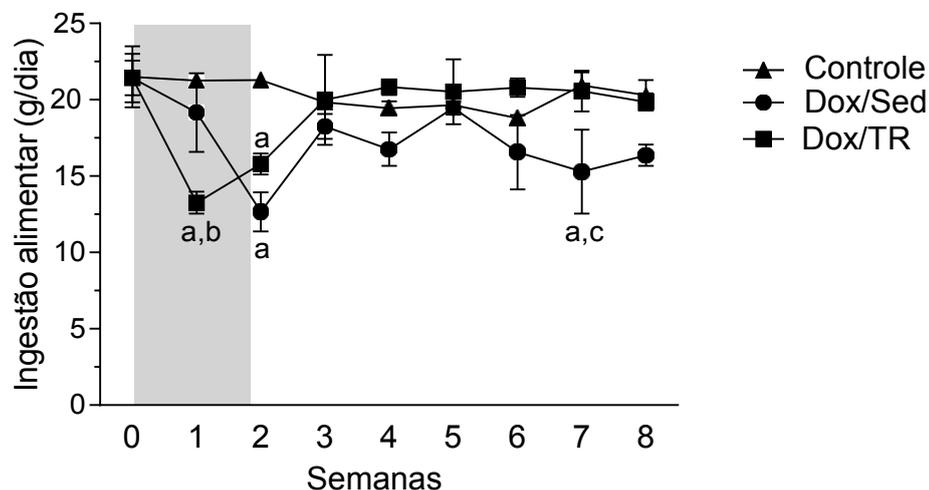
Nota: Valores apresentados como média  $\pm$  EPM. O acompanhamento da massa corporal foi comparado com ANOVA two-way com pós-teste de Holm-Sidak.

Fonte: A Autora, 2023.

### 4.3 Ingestão alimentar

Em relação à ingestão alimentar dos animais ao longo das oito semanas (Figura 8), pode-se observar que a média de consumo dos grupos Dox/Sed e Dox/TR reduziu no período de administração da doxorrubicina comparado ao grupo Controle. Importante ressaltar, que o treinamento resistido regular foi capaz de alterar o padrão alimentar após o período de administração da doxorrubicina que permaneceu semelhante ao controle até a oitava semana, o que não foi observado nos animais sedentários.

Figura 8 – Ingestão alimentar dos animais ao longo das 8 semanas.



Legenda: Dox: doxorrubicina; Sed: sedentário; TR: treinamento resistido. n=10-16 por grupo. <sup>a</sup> $P < 0,05$  vs. Controle; <sup>b</sup> $P < 0,05$  vs. Dox/Sed; <sup>c</sup> $P < 0,05$  vs. Dox/TR.

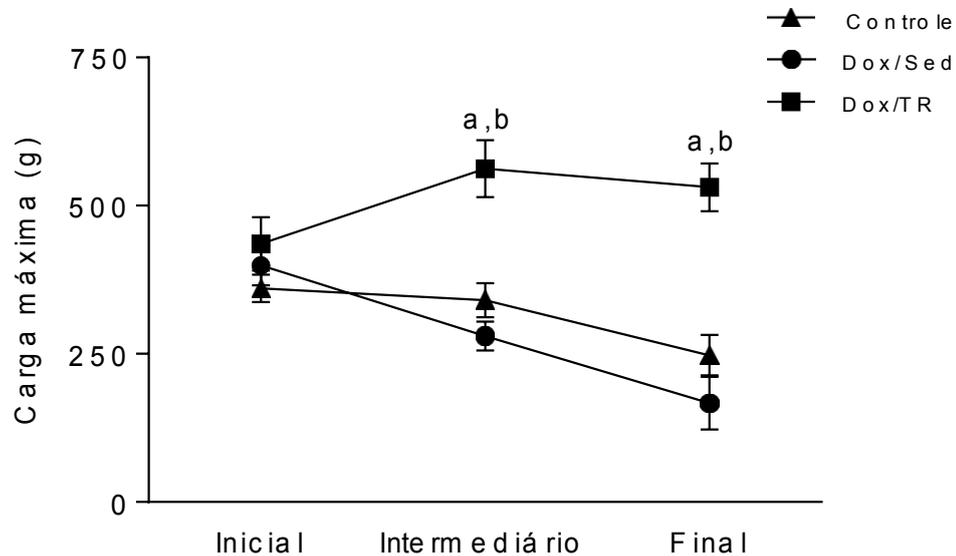
Nota: Dados são apresentados como média  $\pm$  EPM. O resto ingestão foi comparado com Anova two-way com pós-teste de Holm-Sidak.

Fonte: A Autora, 2023.

### 4.4 Treinamento resistido e força

Aumentos significativos na força muscular, medida pelo teste de carga máxima, foram observados no grupo Dox/TR nos momentos intermediário e final em relação ao momento inicial (+22%,  $P < 0,05$ ). Na comparação intergrupos, o grupo Dox/TR apresentou valores significativamente maiores de carga máxima em relação aos grupos Controle e Dox/Sed nos momentos intermediário (+65%,  $P \leq 0,01$  e +100%,  $P \leq 0,01$ , respectivamente) e final (+114%,  $P \leq 0,01$  e +218%,  $P \leq 0,01$ , respectivamente). A Figura 9 apresenta os resultados dos testes de força, realizados em diferentes momentos do protocolo experimental.

Figura 9 – Teste de carga máxima inicial, intermediário e ao final das 8 semanas.



Legenda: Dox: doxorubicina; Sed: sedentário; TR: treinamento resistido. n=10-16 por grupo. <sup>a</sup> $P < 0,05$  vs. Controle; <sup>b</sup> $P < 0,05$  vs. Dox/Sed.

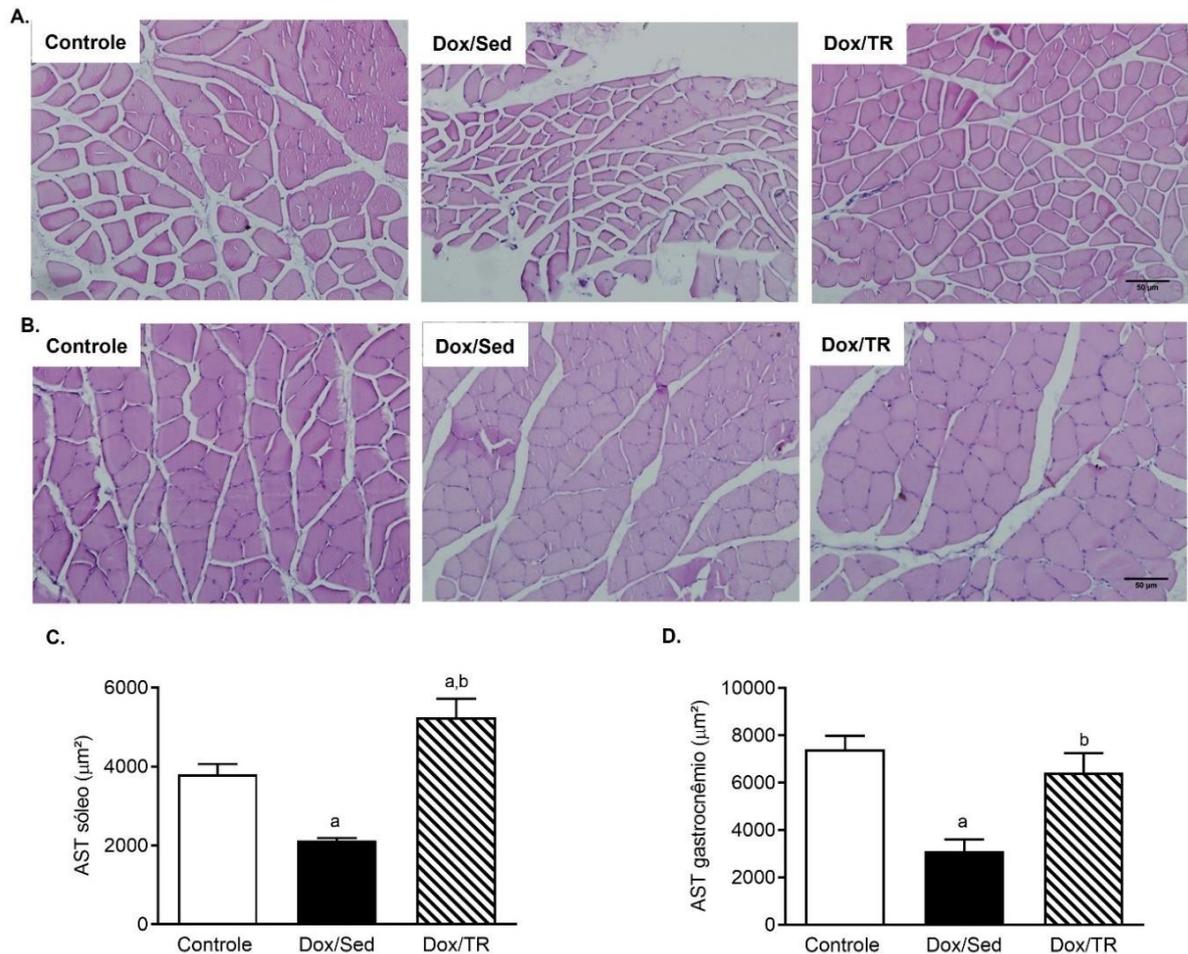
Nota: Dados são apresentados como média  $\pm$  EPM. O teste de carga foi comparado com Anova one-way com pós-teste de Holm-Sidak.

Fonte: A Autora, 2023.

#### 4.5 Análise por microscopia de luz

Uma fotomicrografia representativa do sóleo e do gastrocnêmio corados com H&E de cada grupo são mostradas nas figuras 10A e 10B. Um achado importante do presente estudo foi que os animais Dox/Sed têm uma área transversal menor dos músculos sóleo (Figura 10C) e gastrocnêmio (Figura 10D) comparado ao grupo Controle (-44%,  $P \leq 0,05$  e -58%,  $P \leq 0,01$ , respectivamente) e o TR foi capaz de prevenir essa redução comparado aos animais Dox/Sed (sóleo: +147%,  $P \leq 0,01$  e gastrocnêmio: +107%,  $P \leq 0,01$ ).

Figura 10 – Fotomicrografia representativas de cortes transversais dos músculos esqueléticos corados com hematoxilina e eosina e a área de secção transversa média



Legenda: Cortes histológicos dos músculos corados em H&E com ampliação de 200x, (A) sóleo e (B) gastrocnêmio; (C) área de secção transversa média do sóleo; (D) gastrocnêmio. AST: área de secção transversa; Dox: doxorubicina; Sed: sedentário; TR: treinamento resistido. n=5 por grupo. <sup>a</sup> $P < 0,05$  vs. Controle; <sup>b</sup> $P < 0,05$  vs. Dox/Sed.

Nota: Dados são apresentados como média  $\pm$  EPM. A área de secção transversa dos miócitos foram comparados com Anova one-way com pós-teste de Holm-Sidak.

Fonte: A Autora, 2023.

#### 4.6 Análise por microscopia eletrônica de transmissão

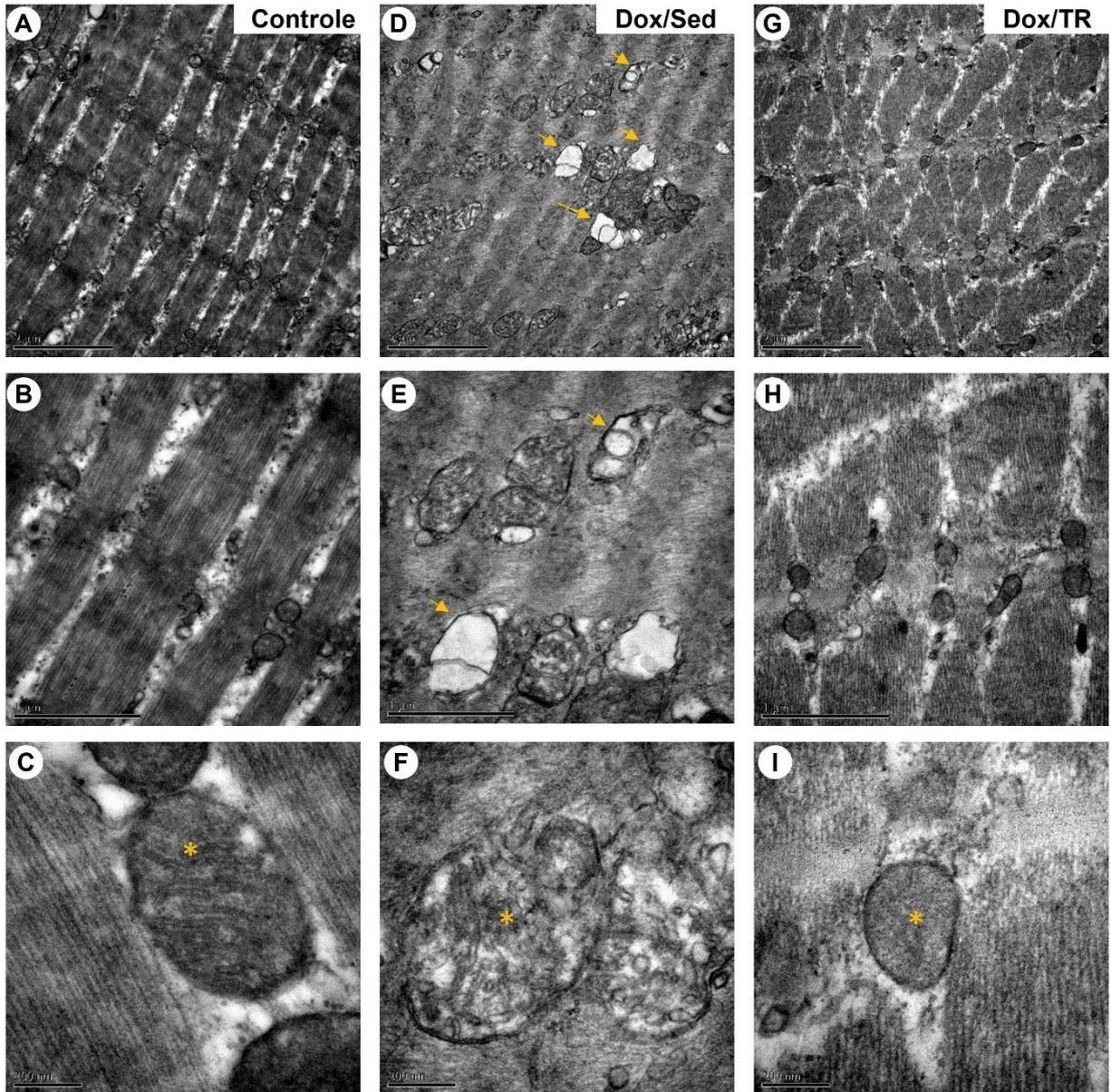
Micrografias eletrônicas dos músculos sóleo e gastrocnêmio são mostradas nas Figuras 11 e 12, respectivamente. Em ambos os músculos, o grupo Controle apresentou ultraestrutura normal, com registro simétrico e paralelo das miofibrilas constituídas por sarcômeros em série (Figura 11A e 12A). O sarcômero é a unidade funcional da fibra muscular, compreendendo o segmento entre duas linhas Z consecutivas, bem visíveis nas figuras, assim como as bandas A e I. As mitocôndrias

são observadas com estrutura e tamanho normais, com cristas preservadas e colocadas em íntimo contato com as miofibrilas (Figuras 11B e 12B). Além disso, pode-se observar a presença de glicogênio (Figura 12C).

A doxorrubicina afetou a ultraestrutura do sóleo e do gastrocnêmio, não havendo distinção clara entre eles. A administração de doxorrubicina resultou em vacuolização citoplasmática, danos mitocondriais e sarcômeros rompidos (Figuras 11D-F, 12D-F) em graus variáveis. A mitocôndria parece ser a organela mais afetada pela doxorrubicina. Tanto no sóleo quanto no gastrocnêmio, as mitocôndrias aparecem inchadas com cristas fragmentadas e matriz rarefeita (Figuras 11F e 12F). Micrografias eletrônicas também sugerem aumento da autofagia no músculo esquelético de animais Dox/Sed. Observou-se a presença de autofagossomas contendo remanescentes de mitocôndrias (Figura 12F), autofagossomos em estágio avançado (Figura 12E), e maior quantidade de corpos residuais na matriz extracelular do grupo Dox/Sed.

Um achado importante foi que o treinamento resistido foi capaz de atenuar o dano causado pela doxorrubicina na ultraestrutura de ambos os músculos. As micrografias eletrônicas evidenciaram muitos campos com miofibrilas e sarcômeros regularmente arranjados, ausência de autofagossomos ou lisossomos e mitocôndrias preservadas (Figuras 11G-I e 12G-I).

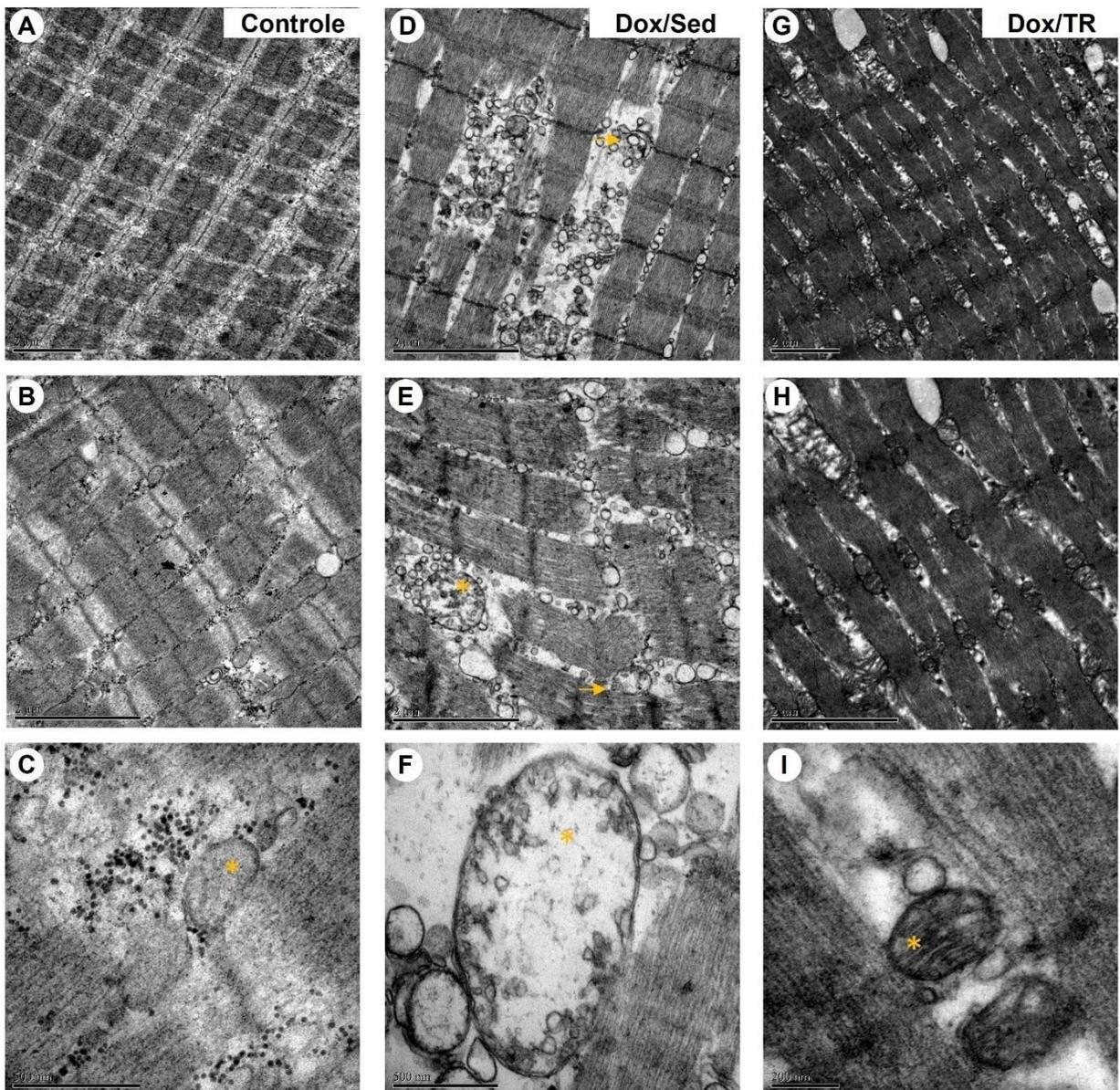
Figura 11 – Micrografias eletrônicas representativas do músculo sóleo.



Legenda: Ratos Controle (A-C), Dox/Sed (D-F), e Dox/TR (G-I). As setas indicam autofagossomos e asteriscos indicam mitocôndrias.

Fonte: A Autora, 2023.

Figura 12 – Micrografias eletrônicas representativas do músculo gastrocnêmio superficial.



Legenda: Ratos Controle (AC), Dox/Sed (DF) e Dox/TR (GI). As setas indicam autofagossomos easteriscos mitocôndrias.

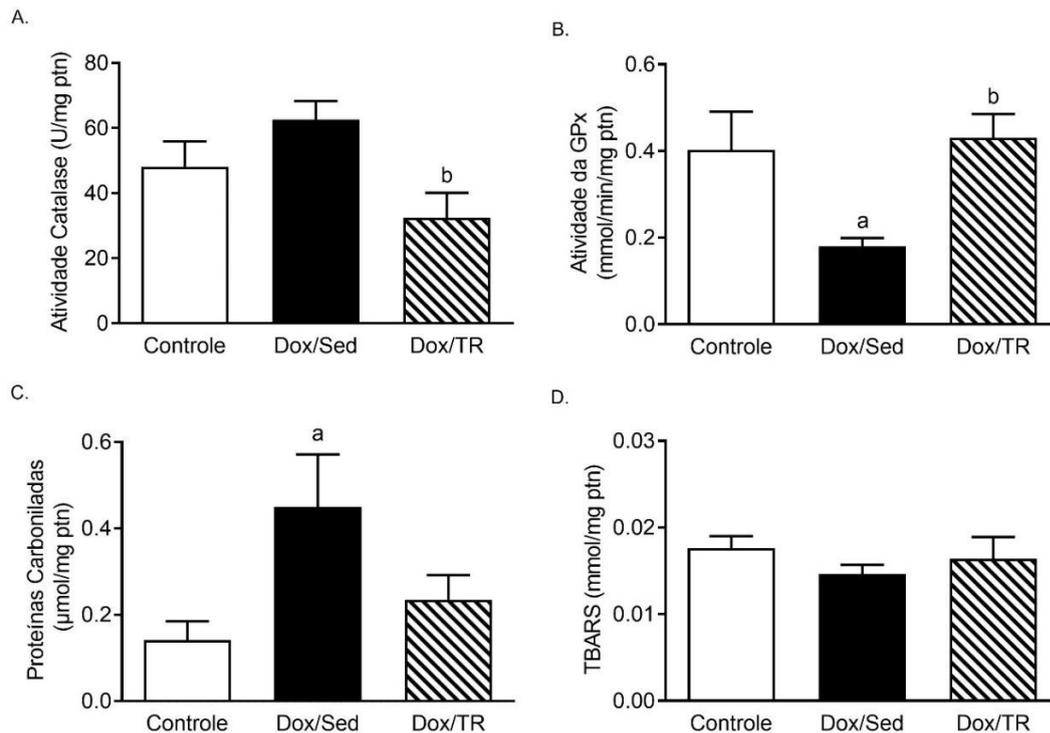
Fonte: A Autora, 2023.

#### 4.7 Biomarcadores de estresse oxidativo em homogenato do músculo gastrocnêmio

Os animais do grupo Dox/TR apresentaram menor atividade da enzima catalase comparada ao grupo Dox/Sed (-48%,  $P \leq 0,05$ ) (Figura 13A). Já a atividade da glutationa peroxidase, os animais do grupo Dox/Sed apresentaram menor atividade desse enzima comparado ao grupo Controle (-55%,  $P \leq 0,05$ ) e o treinamento físico foi capaz de reverter

esse quadro (+140%, 0,05) (Figura 13B). Em relação a dano a proteínas, pode-se observar que os animais do grupo Dox/Sed apresentaram maior dano proteico comparado ao grupo controle (+218%,  $P \leq 0,05$ ), mas não diferem do grupo Dox/TR (Figura 13C). Em relação ao dano lipídico (Figura 13D), não houve diferença significativa entre os grupos.

Figura 13 – Biomarcadores de estresse oxidativo no músculo gastrocnêmio.



Legenda: (A) Atividade da Catalase; (B) Atividade da Glutathiona peroxidase; (C) Proteínas carboniladas; (D) Ensaio de peroxidação lipídica por substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico. DOX: doxorubicina; Sed: sedentário; TR: treinamento resistido.  $n=8$  por grupo. <sup>a</sup> $P < 0,05$  vs. Controle; <sup>b</sup> $P < 0,05$  vs. Dox/Sed.

Nota: Dados são apresentados como média  $\pm$  EPM. Os biomarcadores foram comparados com Anova de uma entrada com pós-teste de Holm-Sidak.

Fonte: A Autora, 2023.

## 4.8 Expressão de proteínas por *Western Blotting*

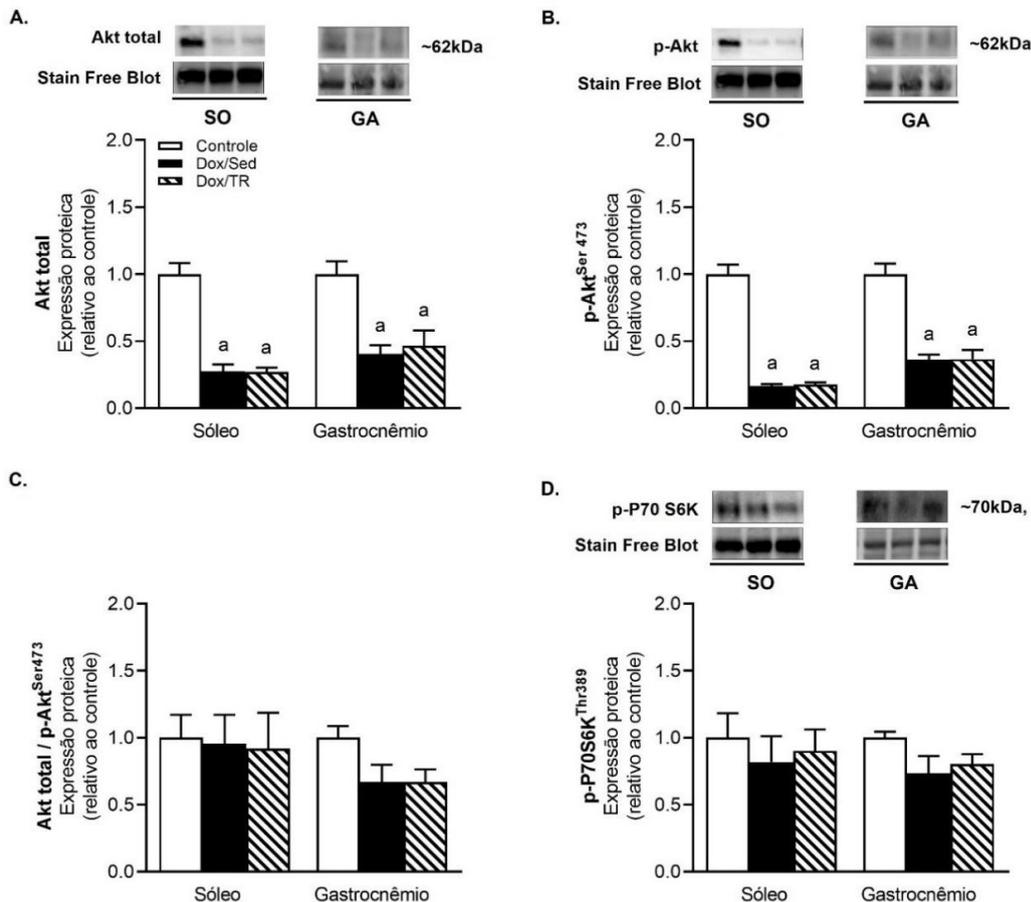
Os níveis de expressão da proteína foram normalizados pela proteína total detectada pelo Stain Free Blot, e todos os resultados são apresentados como porcentagem do grupo Controle.

### 4.8.1 Marcadores de síntese proteica

Em relação à expressão de proteínas envolvidas no anabolismo (Figura 14), a Akt total

foi reduzida nos grupos Dox/Sed e Dox/RT em relação ao Controle no sóleo (-72%,  $P \leq 0,01$  e -72%,  $P \leq 0,01$ , respectivamente) e gastrocnêmio (-59%,  $P \leq 0,01$  e -53%,  $P \leq 0,01$ , respectivamente) músculos (Figura 14A). A p-Akt<sup>Ser473</sup> também foi reduzida nos grupos Dox/Sed e Dox/RT em relação ao Controle no sóleo (-83%,  $P \leq 0,01$  e -84%,  $P \leq 0,01$ , respectivamente) e gastrocnêmio (-63%,  $P \leq 0,01$  e -63%,  $P \leq 0,01$ , respectivamente) (Figura 14B). Não houve diferença significativa na relação p-Akt<sup>Ser473</sup>/Akt total entre os grupos, (Figura 14C) assim como na expressão de P70S6K<sup>Thr389</sup> fosforilada (Figura 14D). Assim, os níveis das proteínas Akt total e p-Akt<sup>Ser473</sup> foram significativamente reduzidos em Dox/Sed e Dox/RT sem alterar sua taxa de fosforilação.

Figura 14 – Expressão proteica de marcadores envolvidos no anabolismo



Legenda: (A) Akt total, (B) fosfo-Akt Ser473, (C) proporção de Akt fosforilada para total e (D) p-P70S6K<sup>Ser389</sup> em homogenato de sóleo e gastrocnêmio. Dox: doxorubicina; SED: sedentário; TR: treinamento resistido. n=5 por grupo. <sup>a</sup> $P < 0,05$  vs. Controle.

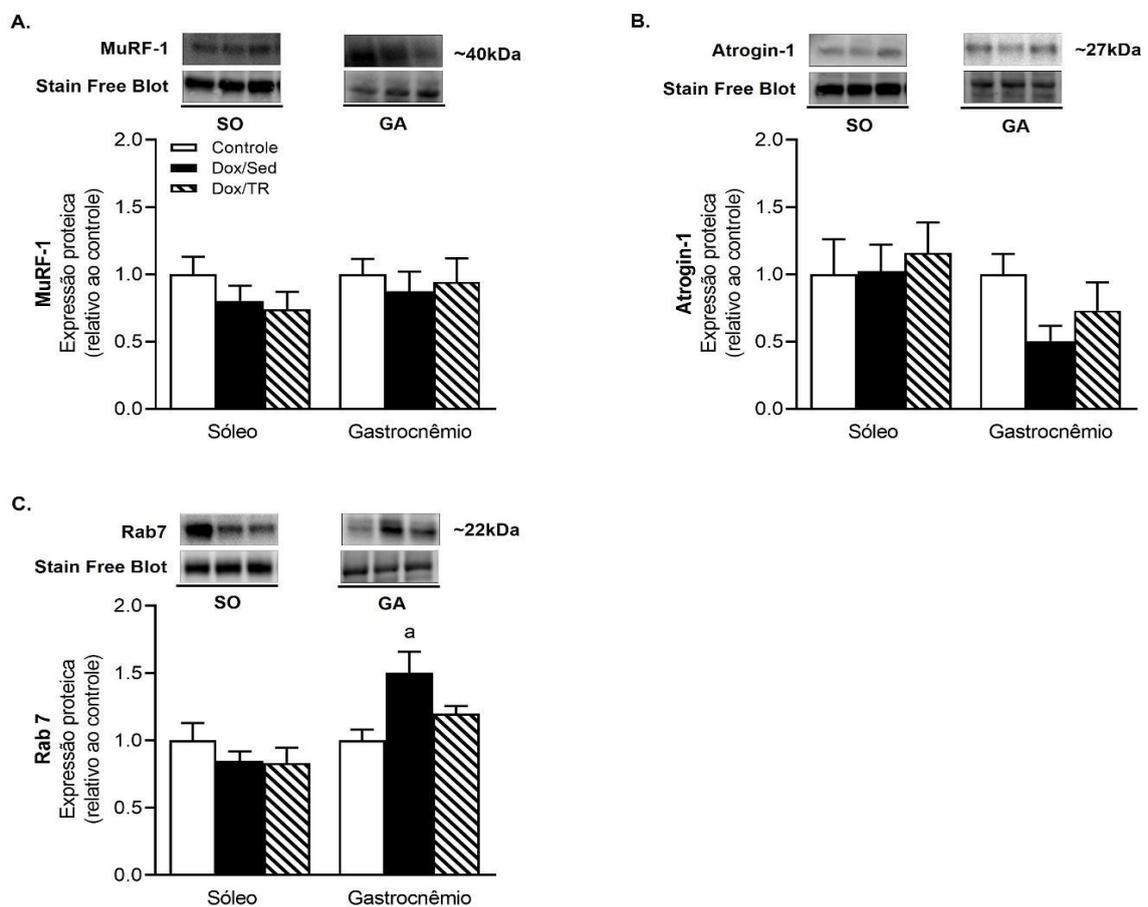
Nota: Dados são apresentados como média  $\pm$  EPM. A expressão das proteínas foram comparados com Anova de uma entrada com pós-teste de Holm-Sidak.

Fonte: A Autora, 2023.

#### 4.8.2 Marcadores de proteólise muscular

A expressão de MuRF-1 (Figura 15A) e Atrogin-1 (Figura 15B), da via de proteólise do UPS, não diferiu entre os grupos em ambos os músculos. No músculo gastrocnêmio, a expressão de Rab 7 (uma proteína com múltiplas funções na via autofagia-lisossomal) foi aumentada no grupo Dox/Sed em comparação ao grupo Controle (+50%,  $P \leq 0,05$ ), mas o mesmo não foi observado no músculo sóleo (Figura 15C).

Figura 15 – Expressão proteica de marcadores envolvidos na proteólise muscular.



Legenda: Expressão proteica de (A) MuRF-1, (B) Atrogin-1 e (C) Rab7 em homogenato de sóleo e gastrocnêmio. Dox: doxorubicina; SED: sedentário; TR: treinamento resistido. n=5 por grupo. <sup>a</sup> $P < 0,05$  vs. Controle.

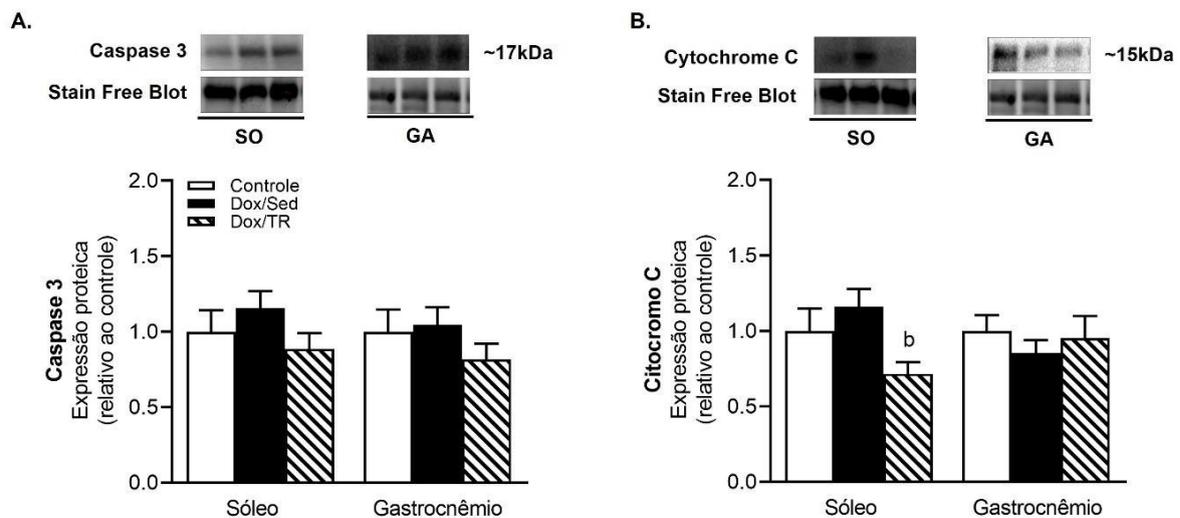
Nota: Dados são apresentados como média  $\pm$  EPM. A expressão das proteínas foram comparadas com Anova one-way com pós-teste de Holm-Sidak.

Fonte: A Autora, 2023.

#### 4.8.3 Marcadores de apoptose

A expressão do Citocromo C foi reduzida em Dox/RT em comparação com Dox/Sed (-38%,  $P \leq 0,05$ ) no músculo sóleo, mas não diferiu entre os grupos no músculo gastrocnêmio (Figura 16B). Em ambos os músculos, a expressão Caspase-3 p17 foi semelhante entre os grupos (Figura 16A).

Figura 16 – Expressão proteica de marcadores envolvidos na apoptose



Legenda: Expressão proteica de (A) Caspase 3 e (B) Citocromo C em homogenato de sóleo e gastrocnêmio. Dox: doxorubicina; SED: sedentário; TR: treinamento resistido.  $n=5$  por grupo. <sup>b</sup> $P < 0,05$  vs. Dox/Sed.

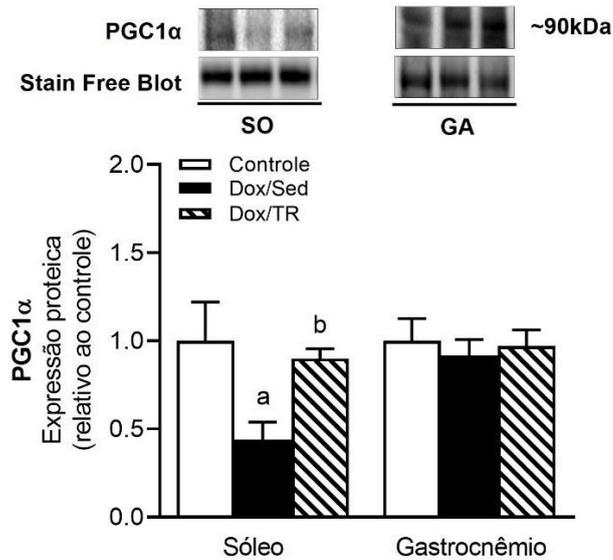
Nota: Dados são apresentados como média  $\pm$  EPM. A expressão das proteínas foram comparadas com Anova one-way com pós-teste de Holm-Sidak.

Fonte: A Autora, 2023.

#### 4.8.4 Marcador de biogênese mitocondrial

A expressão de PGC1- $\alpha$  (Figura 17), proteína envolvida na biogênese mitocondrial, foi reduzida no grupo Dox/Sed em comparação ao grupo Controle (-56%,  $P \leq 0,05$ ), e o TR foi benéfico e capaz de aumentar sua expressão no músculo sóleo (+104%,  $P \leq 0,05$ ). No músculo gastrocnêmio não foi encontrada diferença na expressão de PGC1- $\alpha$ .

Figura 17 – Expressão proteica de marcador envolvido na biogênese mitocondrial.



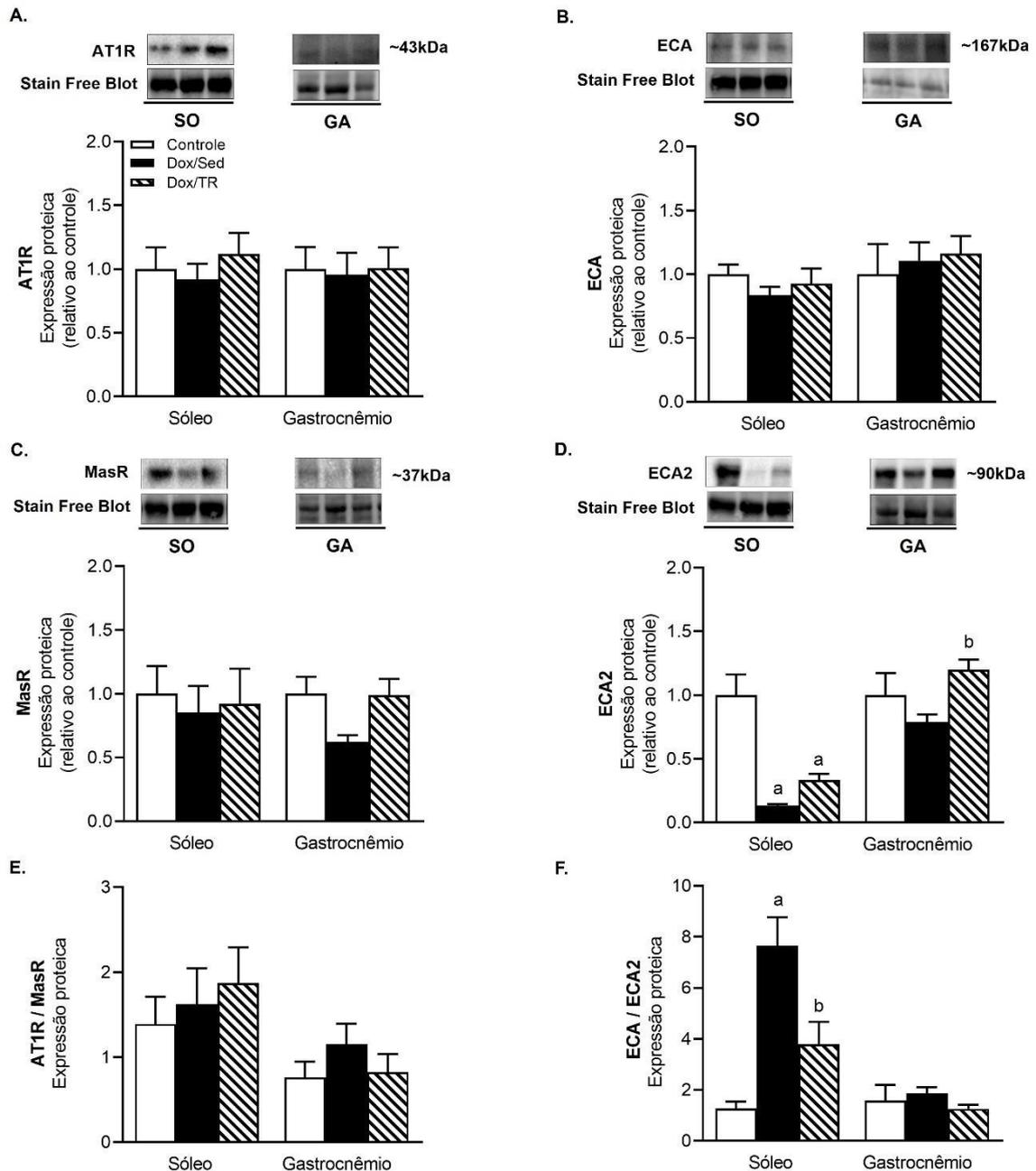
Legenda: Expressão proteica de PGC1 $\alpha$  em homogenato de sóleo e gastrocnêmio. Dox: doxorubicina; SED: sedentário; TR: treinamento resistido. n=5 por grupo. <sup>a</sup> $P < 0,05$  vs. Controle; <sup>b</sup> $P < 0,05$  vs. Dox/Sed. Nota: Dados são apresentados como média  $\pm$  EPM. A expressão das proteínas foram comparadas com Anova one-way com pós-teste de Holm-Sidak.

Fonte: A Autora, 2023.

#### 4.8.5 Componentes do SRA

Em relação a expressão proteica dos componentes do SRA (Figura 18), a expressão de AT1R (Figura 18A), MasR (Figura 18C), a razão entre elas (Figura 18E) e ECA (Figura 18B) foi semelhante entre os grupos em ambos os músculos. No entanto, a expressão de ECA2 (Figura 18D) foi reduzida nos grupos Dox/Sed e Dox/TR em relação ao grupo Controle (-87%,  $P \leq 0,001$  e -67%,  $P \leq 0,05$ , respectivamente) no músculo sóleo. No gastrocnêmio, ECA2 foi aumentada no grupo Dox/TR em relação ao grupo Dox/Sed (+52%,  $P \leq 0,05$ ) (Figura 18D). A relação de ECA/ECA2 (Figura 18F) foi aumentada no Dox/Sed em comparação ao Controle (+496%,  $P \leq 0,01$ ) no músculo sóleo e o treinamento resistido foi capaz de prevenir esse aumento (+102%,  $P \leq 0,05$ ), mas o mesmo não foi observado no gastrocnêmio.

Figura 18 – Expressão proteica dos componentes do SRA



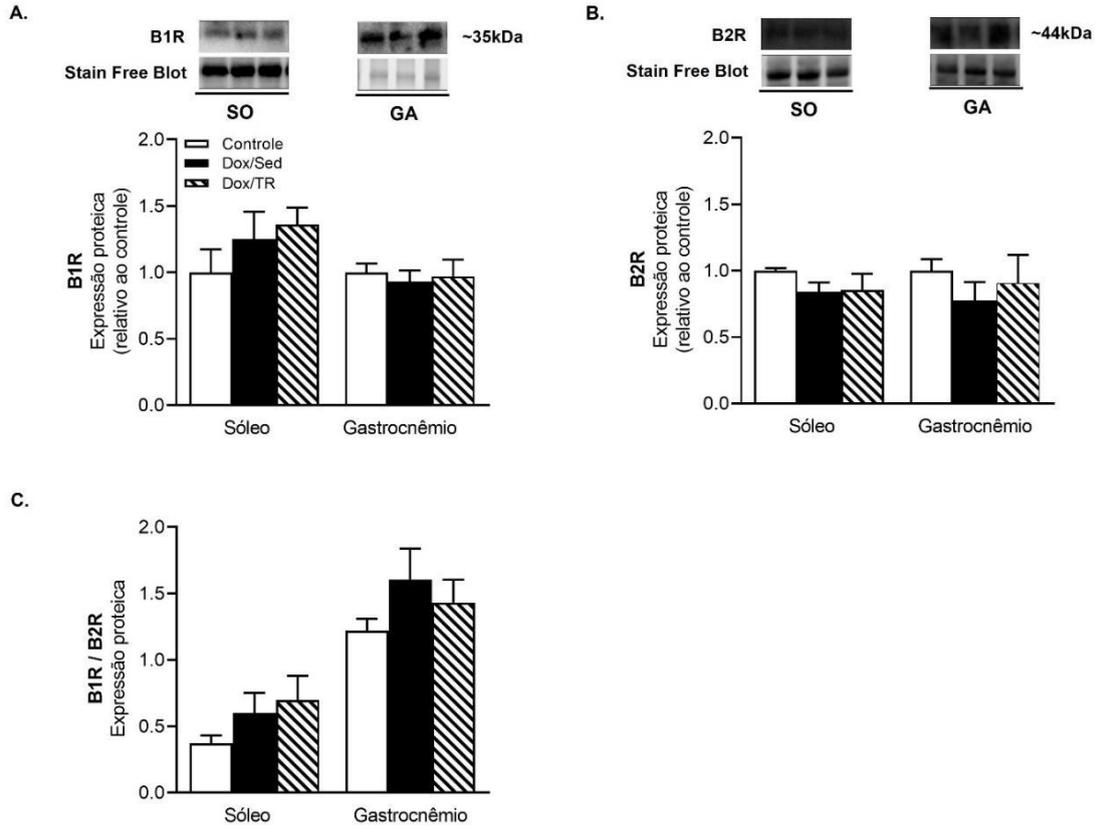
Legenda: Expressão proteica de (A) AT1R; (B) ECA; (C) MasR; (D) ECA2; (E) razão entre AT1R/MasR; (F) razão entre ECA/ECA2 em homogenato de sóleo e gastrocnêmio. Dox: doxorubicina; SED: sedentário; TR: treinamento resistido. n=5 por grupo. <sup>a</sup>P<0,05 vs. Controle; <sup>b</sup>P<0,05 vs. Dox/Sed.

Nota: Dados são apresentados como média ± EPM. A expressão das proteínas foram comparadas com Anova one-way com pós-teste de Holm-Sidak.

Fonte: A Autora, 2023.

Já a expressão dos receptores de bradicininas (Figura 19), B1R, B2R e a relação entre elas foi semelhante entre os grupos em ambos os músculos.

Figura 19 – Expressão proteica dos receptores de bradicinina.



Legenda: Expressão proteica de (A) B1R; (B) B2R e (C) razão entre B1R/B2R em homogenato de sóleo gastrocnêmio. Dox: doxorubicina; SED: sedentário; TR: treinamento resistido. n=5 por grupo.

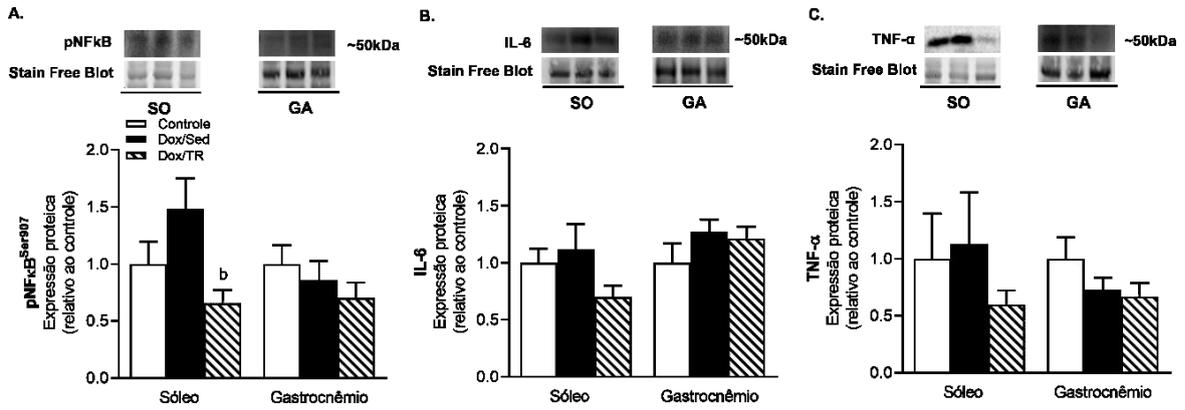
Nota: Dados são apresentados como média  $\pm$  EPM. A expressão das proteínas foram comparadas com Anova one-way com pós-teste de Holm-Sidak.

Fonte: A Autora, 2023.

#### 4.8.6 Inflamação

Em relação as proteínas envolvidas na inflamação (Figura 20). No sóleo, a expressão proteica de pNFkB estava reduzida no grupo Dox/TR comparada ao grupo Dox/Sed (-56%,  $P \leq 0,05$ ) (Figura 20A). No entanto, o mesmo não foi observado no músculo gastrocnêmio. Já a expressão proteica de IL-6 e TNF- $\alpha$  foi semelhante entre os grupos em ambos os músculos (Figura 20B e 20C, respectivamente).

Figura 20 – Expressão de proteínas envolvidas na inflamação



Legenda: Expressão proteica de (A) pNF-κB; (B) IL-6 e (C) TNF-α em homogenato de sóleo e gastrocnêmio. Dox: doxorubicina; SED: sedentário; TR: treinamento resistido. n=5 por grupo.

Nota: Dados são apresentados como média ± EPM. A expressão das proteínas foram comparadas com Anova one-way com pós-teste de Holm-Sidak.

Fonte: A Autora, 2023.

## 5 DISCUSSÃO

As principais descobertas do presente estudo foi que o treinamento resistido levou a uma redução na mortalidade, preveniu o declínio da força geral e a atrofia do músculo esquelético após a administração de doxorubicina. Além disso, o treinamento resistido aumentou a expressão de uma das proteínas envolvidas na biogênese mitocondrial e atenuou o dano mitocondrial induzido pelo tratamento com doxorubicina. Os níveis de expressão proteica de Akt total e p-Akt Ser473 no homogeneizado gastrocnêmio e sóleo, uma importante proteína sinalizadora envolvida na hipertrofia muscular fisiológica, foram significativamente reduzidos em ambos os grupos de doxorubicina, sugerindo que a síntese proteica pode ser suprimida por esta droga, e não foi regulado positivamente pelo treinamento de resistência. A expressão de proteínas envolvidas na degradação muscular da via UPS e na apoptose não diferiu entre os grupos. Entretanto, aqui observamos aumento do dano a proteínas, através da avaliação das proteínas carboniladas, podendo justificar em partes as alterações evidenciadas nas micrografias em ambos os músculos. Ademais, as micrografias eletrônicas evidenciaram a presença de autofagossomos tanto no sóleo quanto no gastrocnêmio do grupo Dox/Sed, o que não foi observado no grupo Dox/RT. Outra descoberta importante foi que o treinamento resistido foi capaz de reduzir a relação de ECA/ECA2, mostrando um possível efeito do treinamento resistido em reduzir a produção de Ang II e aumentar a de Ang 1-7.

É importante destacar um ponto: em estudos experimentais, o regime de administração de doxorubicina difere do que normalmente é visto na clínica. Como pretendemos estudar os efeitos adversos, na indução da cardiotoxicidade e da miotoxicidade, o protocolo de administração foi diferente dos clínicos. Aqui nós usamos uma dosagem de 1mg/kg/dia durante 10 dias consecutivos. Este esquema de dosagem diária foi escolhido com base no estudo de Hayward e Hydock que comparou três esquemas de dosagem e demonstrou que ambos uma dose diária de 1 mg/kg/d por 10 dias ou uma dose semanal de 2mg. kg<sup>-1</sup> por 5 semanas resultou em sinais clássicos de cardiomiopatia induzida por doxorubicina e melhor sobrevida do que uma única dosagem em bolus de 10 mg. dose kg<sup>-1</sup> (LYON; LÓPEZ-FERNÁNDEZ; COUCH; ASTEGGIANO et al., 2022). Como os animais foram submetidos a um período de treinamento físico, necessitava de um protocolo que resultasse em maior sobrevida. Como esperado, uma alta taxa de mortalidade é observada em protocolos experimentais como este. Estudos demonstram uma mortalidade esperada cerca de 30% dos animais tratados com doxorubicina (LYON; LÓPEZ-FERNÁNDEZ; COUCH; ASTEGGIANO et al., 2022), justificando assim um

número maior de animais utilizados nos grupos tratados com essa droga. No entanto, poucos estudos relataram a taxa de mortalidade de animais tratados com doxorubicina e submetidos a treinamento físico, provavelmente porque a maioria deles aplicou uma única dose em bolus de doxorubicina em animais previamente treinados ou não treinados e o sacrifício ocorreu dias depois (NAAKTGEBOREN; BINYAM; STUIVER; AARONSON et al., 2021). Trabalhos do nosso grupo de pesquisa, publicaram anteriormente o benefício do treinamento aeróbio na prevenção da mortalidade em animais tratados com doxorubicina (MATSUURA; BRUNINI; CARVALHO; RESENDE et al., 2010; SEQUEIRA; MARTINS; ALVES; NASCIMENTO et

al., 2021). Em 2021, por exemplo, Siqueira et al. publicaram que perderam 31,2% dos animais que foram tratados com doxorubicina e que todos os animais submetidos ao treinamento aeróbio sobreviveram. No entanto, nenhum estudo demonstrou o efeito do treinamento resistido na sobrevivência, e aqui demonstramos que o treinamento resistido reduziu a taxa de mortalidade em 18% em comparação com animais sedentários.

A fadiga é um dos principais efeitos colaterais de regimes quimioterápicos e, portanto, qualquer intervenção que aborde esta questão é relevante para pacientes com câncer. Vale ressaltar que a fadiga é um sintoma e não existe nenhum teste objetivo para mensurá-la, principalmente em ratos. A doxorubicina é conhecida por ter efeitos tóxicos no coração, mas também é conhecido por causar fadiga que pode resultar de disfunção muscular. Um estudo demonstrou que pacientes sob tratamento à base de antraciclinas revelou que 47% documentam fadiga de grau 4, categorizada como incapacitante e afetando as capacidades físicas dos pacientes (GILLIAM; ST. CLAIR, 2011). A disfunção muscular é um problema grave observadas nos pacientes em tratamento. Atrofia das fibras musculares e rarefação mitocondrial foram observadas em biópsias do músculo vasto lateral de pacientes com câncer de mama submetidas a quimioterapia (GUIGNI; CALLAHAN; TOURVILLE; MILLER et al., 2018). Além disso, estudos experimentais demonstraram que o tratamento com a doxorubicina induz alterações no metabolismo energético da célula e nos canais para cálcio, e estão associados a uma redução da capacidade do músculo esquelético de gerar força, da força máxima de contração e fadiga (BREDAHL; BUSEKRUS; HYDOCK, 2020; BREDAHL; PFANNENSTIEL; QUINN; HAYWARD et al., 2016; GILLIAM; FISHER-WELLMAN; LIN; MAPLES et al., 2013; HAYWARD; HYDOCK; GIBSON; GREUFE et al., 2013; HYDOCK;

LIEN; JENSEN; SCHNEIDER et al., 2011). Assim, são necessárias estratégias para minimizar esses efeitos. Aqui testamos se o treinamento resistido poderia ter atenuado alguns desses efeitos, por ser um tipo de exercício capaz de aumentar a massa e a força muscular esquelética

em qualquer população (GARBER; BLISSMER; DESCHENES; FRANKLIN et al., 2011).

Os resultados do teste de sobrecarga máxima mostraram que o treinamento resistido aumentou a força global nos animais tratados com doxorrubicina, enquanto os animais sedentários apresentaram declínio na força muscular, evidenciando a eficácia do protocolo empregado em nosso estudo. Achados semelhantes foram relatados, mas com força muscular local (por exemplo, força de preensão) ou força medida em músculos isolados (BREDAHL; SHARIF; SIEDLIK; WAGNER et al., 2020). Além disso, é importante destacar que o aumento da força muscular pode ter implicações clínicas relevantes, como melhora na capacidade funcional e qualidade de vida dos pacientes. Já a redução da força muscular está associada com maior risco de quedas, fraturas, incapacidade funcional e principalmente hospitalizações. É importante ressaltar que o aumento do nível de atividade física por meio da corrida em rodas não afetou a eficácia antitumoral da doxorrubicina em roedores, conforme demonstrado por Parry et al. (PARRY; HAYWARD, 2015), e acreditamos que isso pode se estender a outros tipos de exercício.

Em nosso estudo, observamos que os animais do grupo Dox/Sed apresentaram menor massa corporal e massa sóleo em comparação aos demais grupos, bem como menor área transversal dos músculos sóleo e gastrocnêmio, sugerindo atrofia muscular esquelética. Uma meta-análise recente mostrou que a doxorrubicina reduz significativamente a massa muscular esquelética em 14% e a massa muscular transversal em 17%, independentemente da predominância do tipo de fibra, uma vez que uma subanálise revelou resultados semelhantes para extensor longo dos dedos, tibial anterior, sóleo ou gastrocnêmio (HIENSCH; BOLAM; MIJWEL; JENESON et al., 2020), mostrando assim que os prejuízos contrateis são observados em todos os fenótipos de fibras musculares. No entanto a magnitude do dano pode diferir entre os diferentes tipos de fibras. Acredita-se que o aumento do estresse oxidativo desempenha um papel, particularmente devido à presença de uma porção quinona na estrutura química da doxorrubicina, que pode levar à produção direta de superóxidos ao interagir com o oxigênio molecular e sofrer ciclagem redox no complexo I da mitocôndria. Músculos esqueléticos com uma proporção maior de fibras musculares tipo I, ricas em mitocôndrias, pode gerar mais espécies de oxigênio reativas, tornando-o mais suscetível a danos oxidativos causados pela doxorrubicina.

Vale ressaltar que o treinamento resistido foi eficaz na proteção contra a atrofia muscular induzida pela doxorrubicina em ambos os músculos esquelético estudados. Sabe-se que um equilíbrio adequado de proteínas musculares é fundamental para manter a massa e a função

muscular, e depende da taxa de síntese e da degradação de proteínas musculares. A principal via anabólica no músculo esquelético – mediada por Akt – foi significativamente deprimida em ambos os grupos tratados com doxorubicina, sugerindo que a síntese proteica pode ser prejudicada pela Dox e não ativada pelo treinamento resistido. Além disso, nenhuma diferença significativa foi encontrada na expressão das proteínas de atrofia muscular MuRF-1 e Atrogin, em desacordo com estudos anteriores que sugeriam que a ativação desta via pode desempenhar um papel fundamental na atrofia muscular induzida pela doxorubicina (HIENSCH; BOLAM; MIJWEL; JENESON et al., 2020).

Embora estudos anteriores sobre degradação de proteínas tenham encontrado marcadores aumentados da via ubiquitina-proteassoma, as evidências são inconsistentes. Nissinen et al. (2016) também investigaram se a atrofia muscular causada pela doxorubicina estava relacionada ao aumento na degradação de proteínas, explorando genes previamente identificados como regulados positivamente ou negativamente na caquexia do câncer. Surpreendentemente, ao contrário de outros estudos, eles não encontraram alterações sistemáticas nesses genes quando expostos à doxorubicina (NISSINEN; DEGERMAN; RÄSÄNEN; POIKONEN et al., 2016). Como alternativa, conduziram uma análise de enriquecimento de conjuntos de genes para identificar pequenas modificações em vários genes. Esta análise revelou um aumento significativo na atividade da via proteolítica e da apoptose, bem como uma tendência na ativação da cascata de caspases. Entre os vários genes relacionados à atrofia muscular, o FoxO1 foi o único gene que demonstrou uma indução significativa pela doxorubicina. Uma possível explicação para a observação de apenas uma leve regulação positiva nas proteínas envolvidas na via proteolítica realizada por Nissinen et al. (2016) poderia estar relacionada à dose de doxorubicina utilizada, a qual foi relativamente baixa em comparação com as doses comumente empregadas (15 mg/kg em oposição aos 20 mg/kg usuais). Aqui, utilizamos uma dose total de 10mg/kg. Isso levanta a possibilidade de que os mecanismos subjacentes à atrofia muscular possam depender da dosagem administrada.

Outra hipótese que levantamos para os achados no nosso estudo, é que além da dose, o tempo de ativação das vias proteolíticas após a administração do medicamento pode ser um fator - na maioria dos estudos, foi medido 24 ou 48 horas após uma injeção de doxorubicina (HIENSCH; BOLAM; MIJWEL; JENESON et al., 2020), e aqui, a expressão da proteína foi medido dois meses após a administração da doxorubicina. Portanto, pode ter havido uma ativação aguda e precoce da via ubiquitina-proteassoma, que não foi detectada após dois meses.

Outra hipótese é que outras vias catabólicas, como a autofagossomo-lisossomal, possam ter contribuído para a perda de massa muscular induzida pela doxorrubicina.

Nossos resultados apoiam esta última hipótese. A análise da ultraestrutura do sóleo e do gastrocnêmio de ratos Dox/Sed revelou autofagossomos em diferentes estágios, incluindo alguns contendo remanescentes de mitocôndrias, sugerindo continuidade mitofagia; e alguns corpos residuais; que são vesículas que contêm material indigerível da digestão lisossomal. É importante ressaltar que tanto a atrofia das miofibras quanto a autofagia foram atenuadas pelo treinamento resistido, demonstrando a eficácia desta intervenção para neutralizar esse efeito adverso da doxorrubicina. Além disso, a ultraestrutura do sóleo e do gastrocnêmio foi relativamente preservada nos animais do grupo Dox/RT. Micrografias eletrônicas de ambos os músculos evidenciaram muitos campos com miofibrilas e sarcômeros regularmente dispostos e mitocôndrias preservadas. Uma estrutura preservada é crucial para a manutenção do funcionamento adequado.

Os efeitos tóxicos da doxorrubicina nos músculos esqueléticos foram demonstrados pela primeira vez por Doroshov (DOROSHOW; DAVIES, 1986) e seus mecanismos têm sido procurados há décadas. As mitocôndrias parecem ser uma organela crucial neste processo. Doroshov e Davies também foram os primeiros a sugerir que a doxorrubicina realiza ciclos redox principalmente no complexo I da cadeia eletrônica mitocondrial, gerando ânion superóxido (DOROSHOW; DAVIES, 1986). Esta espécie reativa de oxigênio pode danificar diretamente lipídios e proteínas, aqui demonstrando aumento de proteínas carboniladas no músculo gastrocnêmio em animais tratados com doxorrubicina. Além disso, a doxorrubicina pode inibir diretamente a respiração mitocondrial e abrir os poros de transição mitocondriais (PEREIRA; PEREIRA; TAVARES; CARVALHO et al., 2016).

A toxicidade mitocondrial induzida pela doxorrubicina pode desencadear respostas autofágicas (inclusive mitofágicas) na tentativa de remover estruturas danificadas, bem como apoptose (YU; PEI; SIN; YIP et al., 2014). Aqui, entretanto, a expressão da proteína caspase 3 não diferiu entre os grupos, apesar dos níveis mais baixos de citocromo c no grupo Dox/RT em comparação ao grupo Dox/Sed. Uma segunda resposta proeminente à DOX é a reprogramação do fluxo metabólico via ativação de PPARs e regulação alterada da biogênese mitocondrial, na tentativa de restaurar a capacidade bioenergética perdida no curso da mitotoxicidade (WALLACE; SARDÃO; OLIVEIRA, 2020). Nossas descobertas demonstram que o treinamento resistido foi capaz de preservar as mitocôndrias, e isso pode ser parcialmente devido ao aumento dos níveis de PGC1 $\alpha$ . Observamos uma redução significativa na expressão

de PGC1 $\alpha$  em animais sedentários tratados com doxorubicina. Por outro lado, os animais submetidos ao treinamento resistido apresentaram aumento significativo na expressão de PGC1 $\alpha$ , indicando uma adaptação positiva ao estresse mecânico induzido pelo exercício físico. Este fator de transcrição é um regulador chave do metabolismo energético (via modulação de PPARs) e biogênese mitocondrial, podendo desempenhar uma resposta compensatória à disfunção mitocondrial (WALLACE; SARDÃO; OLIVEIRA, 2020). Acreditamos que a integridade desta organela é central para os efeitos benéficos desta intervenção, devido ao seu papel nos determinantes moleculares e celulares da toxicidade da doxorubicina.

Neste estudo, exploramos o papel do Sistema Renina-Angiotensina (SRA) no músculo esquelético após a exposição à doxorubicina, marcando a primeira investigação desse tipo. Embora a maioria das pesquisas tenha se concentrado no SRA em relação à cardiotoxicidade induzida pela doxorubicina, a literatura clínica e pré-clínica disponível confirma sua influência na origem da cardiotoxicidade. Estudos anteriores, como o de Kalam et al. (2015), examinaram diversas abordagens preventivas e destacaram a eficácia dos antagonistas do SRA na redução significativa do risco de eventos cardíacos associados à quimioterapia (KALAM; MARWICK, 2013). Além disso, uma meta-análise de rede conduzida por Abdel-Oadir et al. (2017) confirmou a eficácia dos antagonistas do SRA na prevenção da cardiotoxicidade, com uma redução de risco de 84% (ABDEL-QADIR; ONG; FAZELZAD; AMIR et al., 2017). Diferentes estratégias de administração desses inibidores, seja antes, durante ou após o tratamento com antraciclina, foram exploradas para a prevenção primária da cardiotoxicidade, com evidências apoiando seu uso concomitante ou mesmo prévio à administração de antraciclina. No entanto, a administração pós-tratamento com antraciclina e quimioterapia tem demonstrado menor eficácia, embora essas observações se baseiem principalmente em modelos pré-clínicos e exijam validação adicional por meio de ensaios clínicos (SOBCZUK; CZERWIŃSKA; KLEIBERT; CUDNOCH-JĘDRZEJEWSKA, 2022).

Em relação ao músculo esquelético, este estudo investigou a hipótese de que o SRA desempenharia um papel importante na atrofia muscular após o tratamento com doxorubicina e avaliou se o treinamento resistido poderia atenuar essa disfunção muscular por meio da modulação desse importante sistema. Neste contexto, notamos um aumento na relação ECA/ECA2 no grupo Dox/Sed, indicando uma predominância da enzima conversora da angiotensina (ECA) em relação à ECA2. A ECA desempenha um papel fundamental na conversão da angiotensina I (Ang I) em Angiotensina II (Ang II). A Ang II, que é produzida por

meio da ação da ECA, tem o potencial de desencadear inflamação e estresse oxidativo nos tecidos musculares. A inflamação crônica é um dos principais contribuintes para a atrofia muscular, uma vez que estimula a quebra de proteínas musculares e inibe a síntese proteica (FRANTZ; PRODEL; BRAZ; GIORI et al., 2018). Assim, torna-se essencial a adoção de estratégias para diminuir a ativação do eixo clássico (ECA/Ang II/AT1R) com o objetivo de mitigar os efeitos adversos associados a esse processo. Acerca do papel da ECA na cardiotoxicidade induzida pela doxorrubicina, na literatura, análises retrospectivas mostraram que o uso simultâneo de IECA em pacientes tratados com doxorrubicina reduziu o risco de deterioração da função ventricular esquerda (FEVE) em 73% (BLAES; GAILLARD; PETERSON; YEE et al., 2010). Estudos posteriores com pacientes tratados com antraciclina ou trastuzumabe confirmaram essa proteção, com uma redução de 23% no risco de cardiotoxicidade e um risco de mortalidade 21% menor, apesar de condições de saúde pré-existent desfavoráveis (WITTAYANUKORN; QIAN; WESTRICK; BILLOR et al., 2018). Além disso, o ensaio OVERCOME avaliou o enalapril e carvedilol na prevenção da disfunção ventricular esquerda causada por antraciclina em pacientes com malignidades hematológicas. Após 6 meses de acompanhamento, os pacientes tratados com enalapril e carvedilol apresentaram uma menor incidência de eventos combinados de morte ou insuficiência cardíaca em comparação com o grupo controle, sugerindo um efeito cardioprotetor desses medicamentos (BOSCH; ROVIRA; SITGES; DOMÈNECH et al., 2013).

No âmbito do nosso estudo, observamos que o treinamento resistido teve o efeito de reduzir a relação entre ECA e ECA2, sugerindo a possibilidade de reduzir a ativação do eixo clássico e, possivelmente, favorecer a ativação do eixo não clássico. Isso é relevante, uma vez que a ECA2 desempenha um papel na produção da molécula Angiotensina 1-7 (Ang 1-7), que tem propriedades benéficas no controle da inflamação e do estresse oxidativo. Portanto, nossos resultados indicam que o treinamento resistido pode influenciar positivamente a relação entre essas enzimas e, potencialmente, mitigar os efeitos adversos associados à atrofia muscular induzida pela doxorrubicina. Além disso, o treinamento resistido mostrou capaz de reduzir a fosforilação da proteína NFkB, importante fator de transcrição para genes envolvidos na inflamação, como as citocinas IL-6 e TNF $\alpha$ . Entretanto, não observamos diferença entre os grupos na expressão proteica dessas citocinas. Continuamos apoiando a hipótese de que a dose e o tempo de resposta para ativação dessas vias, pode ser um fator crucial para não observação dessas alterações.

## **CONCLUSÃO**

Concluindo, nossos resultados sugerem que o treinamento resistido pode ser uma estratégia para minimizar a perda de massa muscular e os efeitos deletérios sobre a sua ultraestrutura induzida pela doxorrubicina. Isto pode ser parcialmente devido à adaptações mitocondriais, redução da autofagia, redução do fator de transcrição de citocinas pro inflamatórias e da modulação SRA. Contudo, é importante destacar que mais estudos são necessários para elucidar os mecanismos moleculares subjacentes a estes efeitos e otimizar a prescrição do treinamento resistido em pacientes submetidos quimioterapia.

## REFERÊNCIAS

ABDEL-QADIR, H.; ONG, G.; FAZELZAD, R.; AMIR, E. *et al.* Interventions for preventing cardiomyopathy due to anthracyclines: a Bayesian network meta-analysis. **Annals of Oncology**, 28, n. 3, p. 628-633, 2017.

ÁBRIGO, J.; SIMON, F.; CABRERA, D.; CABELLO-VERRUGIO, C. Angiotensin-(1-7) prevents skeletal muscle atrophy induced by transforming growth factor type beta (TGF- $\beta$ ) via mas receptor activation. **Cellular Physiology and Biochemistry**, 40, n. 1-2, p. 27-38, 2016.

ARGILÉS, J. M.; BUSQUETS, S.; STEMMLER, B.; LÓPEZ-SORIANO, F. J. Cancer cachexia: understanding the molecular basis. **Nature Reviews Cancer**, 14, n. 11, p. 754-762, 2014.

AYLA, S.; SECKIN, I.; TANRIVERDI, G.; CENGIZ, M. *et al.* Doxorubicin induced nephrotoxicity: protective effect of nicotinamide. **International journal of cell biology**, 2011, 2011.

BARTLETT, J. J.; TRIVEDI, P. C.; PULINILKUNNIL, T. Autophagic dysregulation in doxorubicin cardiomyopathy. **Journal of molecular and cellular cardiology**, 104, p. 1-8, 2017.

BASSER, R. L.; GREEN, M. D. Strategies for prevention of anthracycline cardiotoxicity. **Cancer treatment reviews**, 19, n. 1, p. 57-77, 1993.

BERTHIAUME, J.; WALLACE, K. B. Adriamycin-induced oxidative mitochondrial cardiotoxicity. **Cell biology and toxicology**, 23, p. 15-25, 2007.

BLAES, A. H.; GAILLARD, P.; PETERSON, B. A.; YEE, D. *et al.* Angiotensin converting enzyme inhibitors may be protective against cardiac complications following anthracycline chemotherapy. **Breast cancer research and treatment**, 122, p. 585-590, 2010.

BONALDO, P.; SANDRI, M. Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy. **Disease models & mechanisms**, 6, n. 1, p. 25-39, 2013.

BOSCH, X.; ROVIRA, M.; SITGES, M.; DOMÈNECH, A. *et al.* Enalapril and carvedilol for preventing chemotherapy-induced left ventricular systolic dysfunction in patients with malignant hemopathies: the OVERCOME trial (prevention of left Ventricular dysfunction with Enalapril and carvedilol in patients submitted to intensive Chemotherapy for the treatment of Malignant hemopathies). **Journal of the American College of Cardiology**, 61, n. 23, p. 2355-2362, 2013.

BREDAHL, E. C.; BUSEKRUS, R. B.; HYDOCK, D. S. The combined effect of creatine and

resistance training on doxorubicin-induced muscle dysfunction. **Nutrition and cancer**, 72, n. 6, p. 939-947, 2020.

BREDAHL, E. C.; PFANNENSTIEL, K. B.; QUINN, C. J.; HAYWARD, R. *et al.* Effects of exercise on doxorubicin-induced skeletal muscle dysfunction. **Med Sci Sports Exerc**, 48, n. 8, p. 1468-1473, 2016.

BREDAHL, E. C.; SHARIF, S.; SIEDLIK, J. A.; WAGNER, M. K. *et al.* Resistance training during chemotherapy with doxorubicin. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, 52, n. 12, p. 2529-2537, 2020.

BRINK, M.; PRICE, S. R.; CHRAST, J.; BAILEY, J. L. *et al.* Angiotensin II induces skeletal muscle wasting through enhanced protein degradation and down-regulates autocrine insulin-like growth factor I. **Endocrinology**, 142, n. 4, p. 1489-1496, 2001.

CAAN, B. J.; FELICIANO, E. M. C.; PRADO, C. M.; ALEXEEFF, S. *et al.* Association of muscle and adiposity measured by computed tomography with survival in patients with nonmetastatic breast cancer. **JAMA oncology**, 4, n. 6, p. 798-804, 2018.

CAPPETTA, D.; DE ANGELIS, A.; SAPIO, L.; PREZIOSO, L. *et al.* Oxidative stress and cellular response to doxorubicin: a common factor in the complex milieu of anthracycline cardiotoxicity. **Oxidative medicine and cellular longevity**, 2017, 2017.

CASSILHAS, R. C.; LEE, K. S.; VENÂNCIO, D. P.; OLIVEIRA, M. G. M. d. *et al.* Resistance exercise improves hippocampus-dependent memory. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 45, p. 1215-1220, 2012.

CHAMPOUX, J. J. DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. **Annual review of biochemistry**, 70, n. 1, p. 369-413, 2001.

CHANG, Y.-L.; LEE, H.-J.; LIU, S.-T.; LIN, Y.-S. *et al.* Different roles of p53 in the regulation of DNA damage caused by 1, 2-heteroannulated anthraquinones and doxorubicin. **The international journal of biochemistry & cell biology**, 43, n. 12, p. 1720-1728, 2011.

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

CISTERNAS, F.; MORALES, M. G.; MENESES, C.; SIMON, F. *et al.* Angiotensin-(1-7) decreases skeletal muscle atrophy induced by angiotensin II through a Mas receptor-

dependent mechanism. **Clinical science**, 128, n. 5, p. 307-319, 2015.

COIRAULT, C.; HAGEGE, A.; CHEMLA, D.; FRATACCI, M.-D. *et al.* Angiotensin-converting enzyme inhibitor therapy improves respiratory muscle strength in patients with heart failure. **Chest**, 119, n. 6, p. 1755-1760, 2001.

DALLA LIBERA, L.; RAVARA, B.; ANGELINI, A.; ROSSINI, K. *et al.* Beneficial effects on skeletal muscle of the angiotensin II type 1 receptor blocker irbesartan in experimental heart failure. **Circulation**, 103, n. 17, p. 2195-2200, 2001.

DAMRAUER, J. S.; STADLER, M. E.; ACHARYYA, S.; BALDWIN, A. S. *et al.* Chemotherapy-induced muscle wasting: association with NF- $\kappa$ B and cancer cachexia. **European journal of translational myology**, 28, n. 2, 2018.

DI MARCO, A. Adriamycin (NSC-123,127): a new antibiotic with antitumor activity. **Cancer Chemoth.Rep.(Part 1)**, 53, p. 33-37, 1969.

DOROSHOW, J.; DAVIES, K. Redox cycling of anthracyclines by cardiac mitochondria. II. Formation of superoxide anion, hydrogen peroxide, and hydroxyl radical. **Journal of Biological Chemistry**, 261, n. 7, p. 3068-3074, 1986.

DOROSHOW, J. H.; TALLENT, C.; SCHECHTER, J. Ultrastructural features of Adriamycin-induced skeletal and cardiac muscle toxicity. **The American journal of pathology**, 118, n. 2, p. 288, 1985.

DU BOIS, P.; PABLO TORTOLA, C.; LODKA, D.; KNY, M. *et al.* Angiotensin II induces skeletal muscle atrophy by activating TFE $\beta$ -mediated MuRF1 expression. **Circulation research**, 117, n. 5, p. 424-436, 2015.

DWIVEDI, M.; SONG, H.-O.; AHNN, J. Autophagy genes mediate the effect of calcineurin on life span in *C. elegans*. **Autophagy**, 5, n. 5, p. 604-607, 2009.

FABRIS, S.; MACLEAN, D. A. Skeletal muscle an active compartment in the sequestering and metabolism of doxorubicin chemotherapy. **PloS one**, 10, n. 9, p. e0139070, 2015.

FANG, J.; NAKAMURA, H.; IYER, A. Tumor-targeted induction of oxidative stress for cancer therapy. **Journal of drug targeting**, 15, n. 7-8, p. 475-486, 2007.

FRANTZ, E. D. C.; GIORI, I. G.; MACHADO, M. V.; MAGLIANO, D. A. C. *et al.* High, but not low, exercise volume shifts the balance of renin-angiotensin system toward ACE2/Mas receptor axis in skeletal muscle in obese rats. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, 313, n. 4, p. E473-E482, 2017.

FRANTZ, E. D. C.; PRODEL, E.; BRAZ, I. D.; GIORI, I. G. *et al.* Modulation of the renin-angiotensin system in white adipose tissue and skeletal muscle: focus on exercise training. **Clinical science**, 132, n. 14, p. 1487-1507, 2018.

GAO, Y.; WANG, R.; JIANG, J.; HU, Y. *et al.* ACEI/ARB and beta-blocker therapies for preventing cardiotoxicity of antineoplastic agents in breast cancer: a systematic review and meta-analysis. **Heart Failure Reviews**, p. 1-11, 2023.

GARBER, C. E.; BLISSMER, B.; DESCHENES, M. R.; FRANKLIN, B. A. *et al.* American College of Sports Medicine position stand. Quantity and quality of exercise for developing and maintaining cardiorespiratory, musculoskeletal, and neuromotor fitness in apparently healthy adults: guidance for prescribing exercise. **Medicine and science in sports and exercise**, 43, n. 7, p. 1334-1359, 2011.

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

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

GILLIAM, L. A.; LARK, D. S.; REESE, L. R.; TORRES, M. J. *et al.* Targeted overexpression of mitochondrial catalase protects against cancer chemotherapy-induced skeletal muscle dysfunction. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, 311, n. 2, p. E293-E301, 2016.

GILLIAM, L. A.; ST. CLAIR, D. K. Chemotherapy-induced weakness and fatigue in skeletal muscle: the role of oxidative stress. **Antioxidants & redox signaling**, 15, n. 9, p. 2543-2563, 2011.

GOMES-SANTOS, I. L.; FERNANDES, T.; COUTO, G. K.; FERREIRA-FILHO, J. C. A. *et al.* Effects of exercise training on circulating and skeletal muscle renin-angiotensin system in chronic heart failure rats. **PLoS One**, 9, n. 5, p. e98012, 2014.

GUIGNI, B. A.; CALLAHAN, D. M.; TOURVILLE, T. W.; MILLER, M. S. *et al.* Skeletal muscle atrophy and dysfunction in breast cancer patients: role for chemotherapy-derived oxidant stress. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, 315, n. 5, p. C744-C756, 2018.

HANDE, K. R. Topoisomerase II inhibitors. **Update on cancer therapeutics**, 3, n. 1, p. 13-26, 2008.

HAYWARD, R.; HYDOCK, D.; GIBSON, N.; GREUFE, S. *et al.* Tissue retention of doxorubicin and its effects on cardiac, smooth, and skeletal muscle function. **Journal of physiology and biochemistry**, 69, p. 177-187, 2013.

HAYWARD, R.; HYDOCK, D. S. Doxorubicin cardiotoxicity in the rat: an in vivo characterization. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, 46, n. 4, p. 20-32, 2007.

HIENSCH, A. E.; BOLAM, K. A.; MIJWEL, S.; JENESON, J. A. *et al.* Doxorubicin-induced skeletal muscle atrophy: elucidating the underlying molecular pathways. **Acta physiologica**, 229, n. 2, p. e13400, 2020.

HULMI, J. J.; NISSINEN, T. A.; RÄSÄNEN, M.; DEGERMAN, J. *et al.* Prevention of chemotherapy-induced cachexia by ACVR2B ligand blocking has different effects on heart and skeletal muscle. **Journal of cachexia, sarcopenia and muscle**, 9, n. 2, p. 417-432, 2018.

HYDOCK, D. S.; LIEN, C.-Y.; JENSEN, B. T.; SCHNEIDER, C. M. *et al.* Characterization of the effect of in vivo doxorubicin treatment on skeletal muscle function in the rat. **Anticancer research**, 31, n. 6, p. 2023-2028, 2011.

IDORN, M.; THOR STRATEN, P. Exercise and cancer: from “healthy” to “therapeutic”? **Cancer Immunology, Immunotherapy**, 66, p. 667-671, 2017.

JANG, Y. C.; RODRIGUEZ, K.; LUSTGARTEN, M. S.; MULLER, F. L. *et al.* Superoxide-mediated oxidative stress accelerates skeletal muscle atrophy by synchronous activation of proteolytic systems. **GeroScience**, 42, p. 1579-1591, 2020.

JIAO, J.; DEMONTIS, F. Skeletal muscle autophagy and its role in sarcopenia and organismal aging. **Current opinion in pharmacology**, 34, p. 1-6, 2017.

KALAM, K.; MARWICK, T. H. Role of cardioprotective therapy for prevention of cardiotoxicity with chemotherapy: a systematic review and meta-analysis. **European journal of cancer**, 49, n. 13, p. 2900-2909, 2013.

KAVAZIS, A. N.; SMUDER, A. J.; POWERS, S. K. Effects of short-term endurance exercise training on acute doxorubicin-induced FoxO transcription in cardiac and skeletal muscle. **Journal of applied physiology**, 117, n. 3, p. 223-230, 2014.

KOUZI, S. A.; UDDIN, M. N. Aerobic exercise training as a potential cardioprotective strategy to

attenuate doxorubicin-induced cardiotoxicity. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, 19, n.3, p. 399-410, 2016.

KWON, O. S.; SMUDER, A. J.; WIGGS, M. P.; HALL, S. E. *et al.* AT1 receptor blocker losartan protects against mechanical ventilation-induced diaphragmatic dysfunction. **Journal of Applied Physiology**, 119, n. 10, p. 1033-1041, 2015.

LEVIS, B. E.; BINKLEY, P. F.; SHAPIRO, C. L. Cardiotoxic effects of anthracycline-based therapy: what is the evidence and what are the potential harms? **The Lancet Oncology**, 18, n. 8, p. e445-e456, 2017.

LEWINTER, C.; NIELSEN, T. H.; EDFORS, L. R.; LINDE, C. *et al.* A systematic review and meta-analysis of beta-blockers and renin-angiotensin system inhibitors for preventing left ventricular dysfunction due to anthracyclines or trastuzumab in patients with breast cancer. **European heart journal**, 43, n. 27, p.2562-2569, 2022.

LI, H.-H.; WILLIS, M. S.; LOCKYER, P.; MILLER, N. *et al.* Atrogin-1 inhibits Akt-dependent cardiachypertrophy in mice via ubiquitin-dependent coactivation of Forkhead proteins. **The Journal of clinical investigation**, 117, n. 11, p. 3211-3223, 2007.

LI, X.; GU, J.; ZHANG, Y.; FENG, S. *et al.* L-arginine alleviates doxorubicin-induced endothelium-dependent dysfunction by promoting nitric oxide generation and inhibiting apoptosis. **Toxicology**, 423, p. 105-111, 2019.

LYON, A. R.; LÓPEZ-FERNÁNDEZ, T.; COUCH, L. S.; ASTEGGIANO, R. *et al.* 2022 ESC Guidelines on cardio-oncology developed in collaboration with the European Hematology Association (EHA), the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology (ESTRO) and the International Cardio-Oncology Society (IC-OS). **Eur Heart J**, 43, n. 41, p. 4229-4361, Nov 1 2022.

MATSUURA, C.; BRUNINI, T. M.; CARVALHO, L. C.; RESENDE, A. C. *et al.* Exercise training in doxorubicin-induced heart failure: effects on the L-arginine-NO pathway and vascular reactivity. **Journal of the American Society of Hypertension**, 4, n. 1, p. 7-13, 2010.

MCGOWAN, J. V.; CHUNG, R.; MAULIK, A.; PIOTROWSKA, I. *et al.* Anthracycline chemotherapy and cardiotoxicity. **Cardiovascular drugs and therapy**, 31, p. 63-75, 2017.

MEESKE, K.; SMITH, A. W.; ALFANO, C. M.; MCGREGOR, B. A. *et al.* Fatigue in breast cancer survivorstwo to five years post diagnosis: a HEAL Study report. **Quality of Life Research**, 16, p. 947-960, 2007.

- MENESES, C.; MORALES, M. G.; ABRIGO, J.; SIMON, F. *et al.* The angiotensin-(1–7)/Mas axis reduces myonuclear apoptosis during recovery from angiotensin II-induced skeletal muscle atrophy in mice. **Pflügers Archiv-European Journal of Physiology**, 467, p. 1975-1984, 2015.
- MIN, K.; KWON, O. S.; SMUDER, A. J.; WIGGS, M. P. *et al.* Increased mitochondrial emission of reactive oxygen species and calpain activation are required for doxorubicin-induced cardiac and skeletal muscle myopathy. **The Journal of physiology**, 593, n. 8, p. 2017-2036, 2015.
- MONTALVO, R. N.; DOERR, V.; NGUYEN, B. L.; KELLEY, R. C. *et al.* Consideration of Sex as a Biological Variable in the Development of Doxorubicin Myotoxicity and the Efficacy of Exercise as a Therapeutic Intervention. **Antioxidants**, 10, n. 3, p. 343, 2021.
- MOTTA-SANTOS, D.; DOS SANTOS, R. A. S.; OLIVEIRA, M.; QADRI, F. *et al.* Effects of ACE2 deficiency on physical performance and physiological adaptations of cardiac and skeletal muscle to exercise. **Hypertension Research**, 39, n. 7, p. 506-512, 2016.
- MOUSA, T. M.; LIU, D.; CORNISH, K. G.; ZUCKER, I. H. Exercise training enhances baroreflex sensitivity by an angiotensin II-dependent mechanism in chronic heart failure. **Journal of applied physiology**, 104, n. 3, p. 616-624, 2008.
- NAAKTGEBOREN, W. R.; BINYAM, D.; STUIVER, M. M.; AARONSON, N. K. *et al.* Efficacy of physical exercise to offset anthracycline-induced cardiotoxicity: A systematic review and meta-analysis of clinical and preclinical studies. **Journal of the American Heart Association**, 10, n. 17, p. e021580, 2021.
- NISSINEN, T.; DEGERMAN, J.; RÄSÄNEN, M.; POIKONEN, A. *et al.* Systemic blockade of ACVR2B ligands prevents chemotherapy-induced muscle wasting by restoring muscle protein synthesis without affecting oxidative capacity or atrogenes. **Scientific reports**, 6, n. 1, p. 32695, 2016.
- PARRY, T. L.; HAYWARD, R. Exercise training does not affect anthracycline antitumor efficacy while attenuating cardiac dysfunction. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, 309, n. 6, p. R675-R683, 2015.
- PEREIRA, G. C.; PEREIRA, S. P.; TAVARES, L. C.; CARVALHO, F. S. *et al.* Cardiac cytochrome c and cardiolipin depletion during anthracycline-induced chronic depression of mitochondrial function. **Mitochondrion**, 30, p. 95-104, 2016.
- POWERS, S. K.; MORTON, A.; HYATT, H.; HINKLEY, M. J. The renin-angiotensin system and skeletal muscle. **Exercise and sport sciences reviews**, 46, n. 4, p. 205, 2018.

- PRASANNA, P. L.; RENU, K.; GOPALAKRISHNAN, A. V. New molecular and biochemical insights of doxorubicin-induced hepatotoxicity. **Life sciences**, 250, p. 117599, 2020.
- RAYSON, D.; SUTER, T.; JACKISCH, C.; VAN DER VEGT, S. *et al.* Cardiac safety of adjuvant pegylated liposomal doxorubicin with concurrent trastuzumab: a randomized phase II trial. **Annals of oncology**, 23, n. 7, p. 1780-1788, 2012.
- ROCHETTE, L.; GUENANCIA, C.; GUDJONCIK, A.; HACHET, O. *et al.* Anthracyclines/trastuzumab: new aspects of cardiotoxicity and molecular mechanisms. **Trends in pharmacological sciences**, 36, n. 6, p. 326-348, 2015.
- SAITOH, M.; ISHIDA, J.; DOEHNER, W.; VON HAEHLING, S. *et al.* Sarcopenia, cachexia, and muscle performance in heart failure: Review update 2016. **International journal of cardiology**, 238, p. 5-11, 2017.
- SANCHES, I.; CONTI, F.; SARTORI, M.; IRIGOYEN, M. *et al.* Standardization of resistance exercise training: effects in diabetic ovariectomized rats. **International journal of sports medicine**, p. 323-329, 2013.
- SANTOS, R.; FERREIRA, A. J.; VERANO-BRAGA, T.; BADER, M. Angiotensin-converting enzyme 2, angiotensin-(1-7) and Mas: new players of the renin-angiotensin system. **J endocrinol**, 216, n. 2, p. R1-R17, 2013.
- SCHIAFFINO, S.; MAMMUCARI, C. Regulation of skeletal muscle growth by the IGF1-Akt/PKB pathway: insights from genetic models. **Skeletal muscle**, 1, n. 1, p. 1-14, 2011.
- SEO, D. Y.; LEE, S. R.; KIM, N.; KO, K. S. *et al.* Humanized animal exercise model for clinical implication. **Pflügers Archiv-European Journal of Physiology**, 466, p. 1673-1687, 2014.
- SEQUEIRA, C. M.; MARTINS, M. A.; ALVES, R.; NASCIMENTO, A. L. R. *et al.* Aerobic exercise training attenuates doxorubicin-induced ultrastructural changes in rat ventricular myocytes. **Life sciences**, 264, p. 118698, 2021.
- SHIGUEMOTO, G.; PRESTES, J.; LEITE, R.; PEREIRA, G. *et al.* Effects of resistance training on matrix metalloproteinase-2 activity and biomechanical and physical properties of bone in ovariectomized and intact rats. **Scandinavian journal of medicine & science in sports**, 22, n. 5, p. 607-617, 2012.
- SINGAL, P. K.; ILISKOVIC, N. Doxorubicin-induced cardiomyopathy. **New England Journal of Medicine**, 339, n. 13, p. 900-905, 1998.

SLINGERLAND, M.; GUCHELAAR, H.-J.; GELDERBLUM, H. Liposomal drug formulations in cancertherapy: 15 years along the road. **Drug discovery today**, 17, n. 3-4, p. 160-166, 2012.

SMUDER, A. J.; KAVAZIS, A. N.; MIN, K.; POWERS, S. K. Exercise protects against doxorubicin-induced markers of autophagy signaling in skeletal muscle. **Journal of applied physiology**, 111, n. 4, p. 1190- 1198, 2011a.

SMUDER, A. J.; KAVAZIS, A. N.; MIN, K.; POWERS, S. K. Exercise protects against doxorubicin-inducedoxidative stress and proteolysis in skeletal muscle. **Journal of Applied Physiology**, 110, n. 4, p. 935- 942, 2011b.

SMUDER, A. J.; KAVAZIS, A. N.; MIN, K.; POWERS, S. K. Doxorubicin-induced markers of myocardial autophagic signaling in sedentary and exercise trained animals. **Journal of applied physiology**, 115, n.2, p. 176-185, 2013.

SOBCZUK, P.; CZERWIŃSKA, M.; KLEIBERT, M.; CUDNOCH-JĘDRZEJEWSKA, A. Anthracycline-induced cardiotoxicity and renin-angiotensin-aldosterone system—from molecular mechanisms to therapeuticapplications. **Heart Failure Reviews**, 27, n. 1, p. 295-319, 2022.

SONG, Y.-H.; LI, Y.; DU, J.; MITCH, W. E. *et al.* Muscle-specific expression of IGF-1 blocks angiotensin II–induced skeletal muscle wasting. **The Journal of clinical investigation**, 115, n. 2, p. 451-458, 2005.

SWAIN, S. M.; WHALEY, F. S.; EWER, M. S. Congestive heart failure in patients treated with doxorubicin: a retrospective analysis of three trials. **Cancer: Interdisciplinary International Journal ofthe American Cancer Society**, 97, n. 11, p. 2869-2879, 2003.

TABONY, A. M.; YOSHIDA, T.; SUKHANOV, S.; DELAFONTAINE, P. Protein phosphatase 2C-alpha knockdown reduces angiotensin II-mediated skeletal muscle wasting via restoration of mitochondrialrecycling and function. **Skeletal muscle**, 4, n. 1, p. 1-15, 2014.

TAKANASHI, S.; BACHUR, N. Adriamycin metabolism in man. Evidence from urinary metabolites. **DrugMetabolism and Disposition**, 4, n. 1, p. 79-87, 1976.

TOIGO, M.; BOUTELLIER, U. New fundamental resistance exercise determinants of molecular andcellular muscle adaptations. **European journal of applied physiology**, 97, p. 643-663, 2006.

TOKO, H.; OKA, T.; ZOU, Y.; SAKAMOTO, M. *et al.* Angiotensin II type 1a receptor mediates doxorubicin-induced cardiomyopathy. **Hypertension Research**, 25, n. 4, p. 597-603, 2002.

TOMICIC, M. T.; KAINA, B. Topoisomerase degradation, DSB repair, p53 and IAPs in cancer cell

resistance to camptothecin-like topoisomerase I inhibitors. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer**, 1835, n. 1, p. 11-27, 2013.

VON HAEHLING, S.; ANKER, S. D. Prevalence, incidence and clinical impact of cachexia: facts and numbers—update 2014. : Springer. 5: 261-263 p. 2014.

WALLACE, K. B.; SARDÃO, V. A.; OLIVEIRA, P. J. Mitochondrial determinants of doxorubicin-induced cardiomyopathy. **Circulation research**, 126, n. 7, p. 926-941, 2020.

WITTAYANUKORN, S.; QIAN, J.; WESTRICK, S. C.; BILLOR, N. *et al.* Prevention of trastuzumab and anthracycline-induced cardiotoxicity using angiotensin-converting enzyme inhibitors or  $\beta$ -blockers in older adults with breast cancer. **American Journal of Clinical Oncology**, 41, n. 9, p. 909-918, 2018.

WU, C.-L.; CORNWELL, E. W.; JACKMAN, R. W.; KANDARIAN, S. C. NF- $\kappa$ B but not FoxO sites in the

MuRF1 promoter are required for transcriptional activation in disuse muscle atrophy. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, 306, n. 8, p. C762-C767, 2014.

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

ZHOU, M.-S.; LIU, C.; TIAN, R.; NISHIYAMA, A. *et al.* Skeletal muscle insulin resistance in salt-sensitive hypertension: role of angiotensin II activation of NF  $\kappa$  B. **Cardiovascular Diabetology**, 14, p. 1-9, 2015.

ZONG, W.-n.; YANG, X.-h.; CHEN, X.-m.; HUANG, H.-j. *et al.* Regulation of angiotensin-(1–7) and angiotensin II type 1 receptor by telmisartan and losartan in adriamycin-induced rat heart failure. **Acta Pharmacologica Sinica**, 32, n. 11, p. 1345-1350, 2011.

**ANEXO – Aprovação do Comitê de Ética**

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE BIOLOGIA ROBERTO ALCANTARA GOMES

**COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS****CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº **CEUA/023/2015** sobre "**Intervenções farmacológicas e não farmacológicas na insuficiência cardíaca induzida por doxorrubicina: efeitos sobre a função plaquetária e cardíaca**" sob a responsabilidade de **Cristiane Matsuura**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética Para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ (CEUA), em **26/05/2015**. Este certificado expira em **26/05/2019**.

Rio de Janeiro, 26 de Maio de 2015.

Prof. Dr. Israel Felzenszwalb  
CEUA/IBRAG/UERJ

Profa. Dra. Patricia C. Lisboa  
CEUA/IBRAG/UERJ

/ass