

TREINAMENTO DE NATAÇÃO PARA CAMUNDONGOS COMO PROPOSTA TERAPÊUTICA PARA A ATROFIA MUSCULAR INDUZIDA PELA CAQUEXIA.

Camila Ueda¹; Luana Garcia Leal Bueno²; Miguel Luiz Batista Júnior³.

Estudante do curso de Licenciatura em Educação Física na Universidade de Mogi das Cruzes; camila_ueda_rock@hotmail.com¹

Estudante do curso de doutorado em Engenharia Biomédica na Universidade de Mogi das Cruzes; lu_garcialeal@hotmail.com²

Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; miguelj@umc.br³

Área do Conhecimento: Ciências da Saúde.

Palavras-Chave: treino *endurance*; exercício; câncer; atrofia muscular.

INTRODUÇÃO

A caquexia é uma síndrome inflamatória crônica que atinge cerca de 80% dos pacientes com câncer e caracterizada pela perda de peso corporal maior que 5%, distúrbios metabólicos e atrofia muscular, sendo esta última capaz de gerar aumento da degradação proteica e diminuição de sua síntese, através de genes responsáveis pela quebra do aparato muscular como o Atrogin-1 e MuRF-1, proporcionando a diminuição da massa muscular, evidências mostram que tais genes estão aumentados na caquexia (ARGILÉS *et al.* 2014; ZHOU *et al.*, 2010). Stefanetti *et al.* (2014) demonstra que o exercício físico é capaz de promover benefícios para pacientes com atrofia muscular por amenizar ou em alguns casos reverter seus sintomas. Em seu estudo verificou que até 12 horas após a prática do exercício é possível observar uma regulação de Atrogin-1 enquanto a regulação da MuRF1 ocorria até 4 horas após o exercício evitando, assim, seus efeitos no músculo. O treinamento de Endurance (TE) vem sendo descrito por gerar vários benefícios à saúde como o aprimoramento das capacidades físicas, diminuição da pressão arterial e diminuição da frequência cardíaca (BIGONDIARI, 2013). A natação é um bom exemplo desse treinamento, capaz de diminuir a tensão nas articulações e a melhora na força e amplitude dos movimentos. Em pessoas portadoras de doenças musculoesqueléticas crônicas e hipertensas, a natação diminui a dor e o inchaço na musculatura esquelética, diminui a pressão sanguínea e melhora o fluxo sanguíneo (BARKER *et al.*, 2014). Pouco se encontra na literatura sobre os efeitos do TE no balanço proteico e impacto na expressão de genes responsáveis pela atrofia muscular. Considerando tal informação, o estudo dos mecanismos relacionados à atrofia muscular torna-se necessário e importante para a compreensão dos mecanismos da atrofia muscular induzida pela caquexia, neste contexto, o exercício se configura como tratamento não farmacológico alternativo frente aos sintomas da síndrome.

OBJETIVOS

Verificar os efeitos do TE realizado através de protocolo de natação para camundongos como alternativa terapêutica com a finalidade de atenuar a atrofia muscular induzida pela caquexia.

METODOLOGIA

Implante tumoral, sacrifício dos animais e coleta dos tecidos: foram inoculadas células LLC subcutaneamente no flanco direito de cada animal ($3,5 \times 10^5$ em 1 ml de solução salina 0,9%).

Os animais foram sacrificados por decaptação sem anestesia 48 horas após a última sessão de treinamento. Os tecidos foram retirados e refrigerados para experimentos posteriores. **Treinamento:** Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais: (1) sedentário sem tumor (SCO n=6); (2) sedentário com tumor (STB n=10); (3) treinado com tumor (TTB n=10); (4) treinado sem tumor (TCO n=12). O protocolo de treinamento teve a duração de 6 semanas, sendo 2 semanas de adaptação e 4 semanas de treinamento, sendo no último dia de adaptação a realização da inoculação das células tumorais. Após a adaptação, o treinamento consistiu em 30 minutos diários, 5 vezes por semana com base no modelo de Wasinski *et al.* (2013). **Reação de Transcrição Reversa:** Foi utilizado 0.8µg de RNA total na reação contendo *Oligodt*(500 µg/mL), 10 mM de cada dNTP, 5x *First-Strand Buffer*, DTT e 200 U de transcriptase reversa (*SuperScript II-Invitrogen*). Para a análise de RT-PCR foi utilizado os genes atrofícos (Murf-1 e atrogin-1) e hipertrofícos (p70 e mTOR) do músculo sóleo. **Análise histológica e histométrica:** foi utilizado o músculo EDL e o Tecido Adiposo Subcutâneo em cortes de 5µm de espessura, as imagens foram digitalizadas em um aumento de 400x e medidas no programa *ImagePro-Plus 6.0*. **Extração de Proteínas Totais:** foi utilizado 30mg para 300uL de RIPA e 1g para 400uL de RIPA do músculo gastrocnêmio. Os tecidos foram homogeneizados e estocados a -20°C. Para a quantificação de proteínas foi utilizado 200uL de solução de trabalho mais 25uL da solução padrão e da amostra numa microplaca transparente e de fundo plano (*Flat Botton*). **Análise Estatística:** A análise estatística foi feita com o software *GraphPadPrism 5*. Para os grupos experimentais e controle o teste utilizado foi Anova oneway e twoway para comparação de mais de duas médias, usando o p<0,05 de significância, seguido pelo pós teste Tukey

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados de massa corporal total e das massas dos tecidos estão evidenciados na tabela 1.

Tabela 1. Massa Corporal e Tecidos

	C				TB			
	n	S 6	TR 10		S 10	TR 12		
Body Weight (g)		25,75 ± 0,52 *	26,15 ± 0,51 &		23,65 ± 0,50 *	23,69 ± 0,38 &		
Tumour Weight (g)					3,96 ± 0,32	1,29 ± 0,30		
Tumour Weight (% MC)					16,71 ± 1,23	5,45 ± 1,29		
Soleus (g)		0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00		0,00 ± 0,50	0,01 ± 0,00		
Soleus (% MC)		0,06 ± 0,00	0,06 ± 0,00		0,05 ± 0,00 \$	0,06 ± 0,00 \$		
Gastrocnemius (g)		0,29 ± 0,01 *	0,28 ± 0,01 &		0,22 ± 0,02 *	0,24 ± 0,01 &		
Gastrocnemius (% MC)		1,15 ± 0,02 *	1,08 ± 0,02		0,95 ± 0,06 *	1,02 ± 0,03		
EDL (g)		0,02 ± 0,00 *	0,02 ± 0,00		0,01 ± 0,00 *	0,02 ± 0,00		
EDL (% MC)		0,08 ± 0,00	0,07 ± 0,00		0,05 ± 0,00	0,07 ± 0,00		
SCAT (g)		0,14 ± 0,02 *	0,14 ± 0,01		0,06 ± 0,01 *\$	0,11 ± 0,01 \$		
SCAT (%MC)		0,55 ± 0,06 *	0,56 ± 0,03 &		0,24 ± 0,04 *	0,45 ± 0,05 &		
MEAT (g)		0,18 ± 0,03 #	0,22 ± 0,02 #		0,15 ± 0,01	0,16 ± 0,01		
MEAT (%MC)		0,70 ± 0,09	0,85 ± 0,08		0,66 ± 0,04	0,67 ± 0,04		

* p < 0,05 - SCO vs STB

& P < 0,05 - COTE vs TETB

p < 0,05 - SCO vs COTE

§ p < 0,05 - STB vs TETB

A atrofia muscular é um dos fatores resultantes da síndrome da caquexia, caracterizada por uma diminuição do anabolismo proteico e aumento do catabolismo. A atrofia da musculatura gera um risco para os pacientes caquéticos por aumentar a morbidez, aumentar a tolerância à fadiga e ocasionar a perda de força (COHEN, NATHAN e GOLDBERG, 2015; MCFARLANE *et al.*, 2006). Neste estudo, aferimos a massa dos tecidos musculares para analisarmos os possíveis efeitos do TE, sendo analisados os tecidos gastrocnêmio, EDL e

sóleo como apresentado na tabela 1. Os animais dos grupos sedentários apresentaram diferenças na massa do músculo gastrocnêmio em sua forma bruta e relativa à massa corporal, apresentando uma redução de 20,1% ($p < 0,05$) nos animais do grupo STB quando comparados aos animais do grupo SCO. O grupo TTB apresentou redução de 10% ($p < 0,05$) do músculo sóleo em relação ao grupo TCO, não havendo alterações no músculo gastrocnêmio e EDL. Diferenças entre os grupos STB e TTB foram observadas no músculo sóleo. O grupo TTB, apesar de sofrer redução da massa muscular, esta se mostrou em menor magnitude em relação ao grupo com tumor sedentário (STB). Além disso, o treinamento aumentou o nível de proteínas totais no músculo gastrocnêmio como pode ser visto na figura 1.

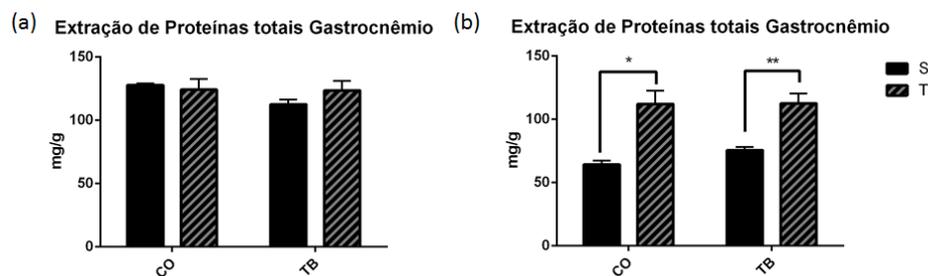


Figura 1. Extração de proteínas totais. (A) músculo sóleo, (B) músculo gastrocnêmio. * representa ($p < 0,05$); ** representa ($p < 0,001$).

Outro fator resultante da síndrome da caquexia é a redução do tecido adiposo branco (BATISTA JR. *et al.*, 2012). Devido a isso, foram analisados os possíveis efeitos do TE sobre o Tecido Adiposo Subcutâneo (TASC) e o Tecido Adiposo Mesentérico (TAME). Em forma relativa à massa corporal, o TASC apresentou redução de 55% nos animais do grupo STB comparados aos animais do SCO, e um aumento de 85% nos animais do grupo TTB quando comparados aos animais STB, o que demonstra a efetividade do treinamento na preservação do TASC. O TAME não apresentou diferenças significativas entre os grupos.

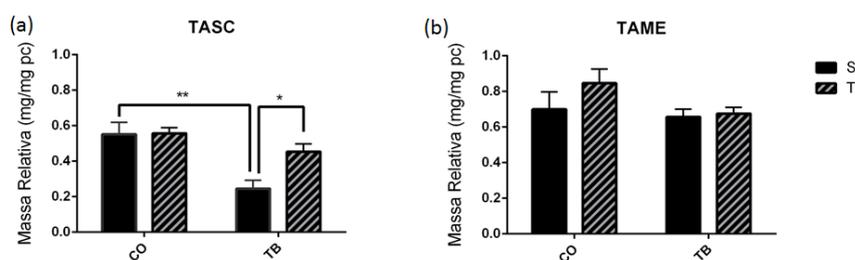


Figura 2. Mensuração do tecido adiposo relativo dos animais sedentários e treinados. (A) Tecido Adiposo Subcutâneo (B) Tecido Adiposo Mesentérico. * representa diferença estatística ($p < 0,05$); ** representa diferença estatística ($p < 0,001$). PC: Peso Corporal; TASC, Tecido Adiposo Subcutâneo; TAME, Tecido Adiposo Mesentérico.

CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo demonstram que: O treinamento de natação foi capaz de preservar ou reverter a redução da massa muscular dos animais com caquexia induzida. Apesar de não ter sido observada modulação na expressão de genes de diferentes vias de hipertrofia e atrofia tendenciosa para o balanço proteico positivo, os animais treinados apresentaram aumento das proteínas totais no músculo esquelético; O treinamento de natação se mostrou

capaz de preservar o tecido adiposo branco subcutâneo por reverter a redução da massa e atrofia dos adipócitos observada nos animais caquéticos sem treinamento.

REFERÊNCIAS

ARGILÉS, J.M.; BUSQUETS, S.; STEMMLER, B.; LÓPEZ-SORIANO, F.J.; Cancer Cachexia: Understanding the Molecular Basis. **Nature**.v. 14, p. 754-762, 2014.

BARKER, A.L.; TALEVSKI, J.; MORELLO, R.T.; BRAND, C.A.; RAHMANN, A.E.; URQUHART, D.M.; Effectiveness of Aquatic Exercise for Musculoskeletal Conditions: A Meta-Analysis. **Physical Medicine and Rehabilitation**. 2014.

BATISTA JR, M.L.; NEVES, R.X.; PERES, S.B.; YAMASHITA, A.S.; SHIDA, C.S.; FARMER, S.R.; SEELAENDER, M.; Heterogeneous Time-Dependent Response of Adipose Tissue During the Development of Cancer Cachexia. **Journal of Endocrinology**. p. 363-373, 2012.

BIGONGIARI, A. **O Efeito do Treinamento Aeróbico em Piscina e Esteira Rolante no Controle Postural de Pessoas com Sequelas Crônicas de Acidente Vascular Cerebral: Ensaio Clínico Randomizado**. 2013. 150 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

COHEN, S.; NATHAN, J.A.; GOLDBERG, A.L.; Muscle Wasting in Disease: Molecular Mechanisms and Promising Therapies. **Nature**.v. 14, p. 58-74, 2015.

MCFARLANE, C.; PLUMMER, E.; THOMAS, M.; HENNEBRY, A.; ASHBY, M; LING, N.; SMITH, H.; SHARMA, M.; KAMBADUR, R.; Myostatin Induces Cachexia by Activating the Ubiquitin Proteolytic System Through an NF- κ B Independent, FoxO1-Dependent Mechanism. **Journal of Cellular Physiology**.p.501-514, 2006

STEFANETTI, R.J.; LAMON, S.; RAHBK, S.K.; FARUP, J.; ZACHAREWICZ, E.; WALLACE, M.A.; VENDELBO, M.H.; RUSSELL, A.P.; VISSING, K.; Influence of Divergent Exercise Contraction Mode and Whey Protein Supplementation on Atrogin-1, MurF-1 and FOXO1/3A in Human Skeletal Muscle. **Journal of Applied Physiology**.2014.

WASINSKI, F.; BACURAU, R.F.P.; MORAES, M.R.; HARO, A.S.; MORAES-VIEIRA, P.M.M.; ESTRELA, G.R.; PAREDES-GAMERO, E.J.; BARROS, C.C.; ALMEIDA, S.S.; CÂMARA, N.O.S.; ARAUJO, A.C.; Exercise and Caloric Restriction Alter the Immune System of Mice Submitted to a High-Fat Diet. **Hindawi Publishing Corporation: Mediator of Inflammation**. p. 1-8, 2013.

ZHOU, X.; WANG, J.L.; LU, J.; SONG, Y.; KWAK, K.S.; JIAO, Q.; ROSENFELD, R.; CHEN, Q.; BOONE, T.; SIMONET, W.S.; LACEY, D.L.; GOLDBERG, A.L.; HAN, H.Q.; Reversal of Cancer Cachexia and Muscle Wasting by ActRIIB Antagonism Leads to Prolonged Survival. **Cell**. v. 142, p. 531-543, 2010.