

Title: Exercise-induced cardioprotection - Effect of life-span voluntary exercise against anti-cancer therapy-induced cardiac and mitochondrial dysfunction

Título: Exercício e cardioproteção - Efeito do exercício voluntário ao longo da vida na toxicidade cardíaca e mitocondrial induzida por terapia anti-cancro

Key words: Exercise, cardiac disease, bioenergetics, apoptosis

3.1. Sumário (5000 c)

Introdução e pertinência: A Doxorubicina (DOX) é um antibiótico de largo espectro utilizado no tratamento de diversos tipos de cancro. Infelizmente, a sua utilidade clínica é limitada pela sua cardiotoxicidade dose-dependente, resultando em disfunção cardíaca crítica. É sabido que a disfunção cardíaca induzida pela DOX está, pelo menos em parte, associada ao incremento do stress oxidativo e apoptose com origem mitocondrial. Têm sido sugeridas várias estratégias terapêuticas e preventivas contra a toxicidade e disfunção causadas pela DOX, incluindo a suplementação antioxidante e o exercício. Os nossos trabalhos prévios têm sugerido que os benefícios do exercício para o sistema cardiovascular de ratos tratados com DOX incluem a protecção tecidual e das mitocôndrias contra o stress oxidativo e apoptose [1-11]. Contudo, os mecanismos responsáveis pela referida protecção com origem mitocondrial permanecem ainda por esclarecer. Efectivamente, as mitocôndrias têm um papel central na bioenergética, regulação do pH e homeostasia do cálcio e sinalização celular. Um evento fisiológico que nos últimos anos tem assumido relevância quer em condições normais associado à morte celular, é o poro de permeabilidade transitória mitocondrial (mtPTP). O mtPTP, associado a situações de stress oxidativo acrescido e sobrecarga de cálcio, encontra-se aumentado em ratos tratados com DOX [12]. Contudo, a acção não farmacológica do exercício contra este fenómeno em animais tratados com DOX nunca foi estudada e constitui o problema central deste projecto inovador

Hipótese de trabalho: A principal hipótese do presente estudo é que o exercício voluntário ao longo da vida previne a elevada susceptibilidade das mitocôndrias cardíacas à indução do mtPTP e de apoptose em ratos tratados cronicamente com DOX

Objetivos específicos e métodos: Têm sido utilizados vários modelos de exercício com resultados positivos na funcionalidade cardíaca avaliada por parâmetros hemodinâmicos, morfológicos, bioquímicos (defesa celular, lesão oxidativa e apoptose) e de função mitocondrial. Os modelos explorados incluem regimes forçados agudos, treino de endurance de intensidade baixa e moderada e roda livre ao longo da vida. Destes, o último parece apresentar maior relevância clínica para sujeitos submetidos a terapia anti-cancerígena uma vez que se caracteriza por ser de baixa intensidade e simular a actividade física habitual voluntária. Este será deste modo considerado neste projecto, assim como o tratamento com doses cumulativas (1 dose semanal de 2mg/kg durante 7 semanas) dado mimetizar o protocolo terapêutico habitual

Ratos macho serão divididos em 4 grupos: Sedentário, DOX (1 dose semanal de 2mg/kg durante 7 semanas), 32 semanas roda livre e roda livre tratados com DOX. 24 horas após o final do período de actividade física e 1 semana após a última injeção, os animais serão sacrificados e as mitocôndrias cardíacas isoladas para os ensaios *in vitro*. Serão avaliados os parâmetros clássicos de funcionalidade (consumo de oxigénio e potencial transmembranar), bem como swelling osmótico e movimentos de cálcio sensíveis à ciclosporina A (para estudar o mtPTP). Serão analisados marcadores de lesão oxidativa, apoptose e antioxidantes na fracção mitocondrial e/ou no homogeneizado cardíaco. O efeito do exercício contra o stress oxidativo mitocondrial *in vitro* induzido pelo par $\text{FeSO}_4\text{-H}_2\text{O}_2$ será avaliado

Significado do trabalho: Serão fornecidas contribuições importantes para o conhecimento dos mecanismos mitocondriais associados ao decréscimo da toxicidade cardíaca durante a realização de terapias anti-neoplásicas. Em função dos resultados, poder-se-á concluir que um estilo de vida activo antes e durante o tratamento com DOX diminui a susceptibilidade à indução do mtPTP e dos níveis de apoptose com origem mitocondrial e deverá assim ser aconselhado

Equipa de investigação: Temos colaborado com o Grupo de Toxicologia Mitocondrial do CNC. Os primeiros têm realizado trabalho de elevada qualidade sobre os efeitos de doses cumulativas de DOX *in vivo* na função mitocondrial e na susceptibilidade à indução de mtPTP por cálcio [13-16] tendo colaborado com o nosso laboratório no estudo dos efeitos do exercício contra a mitocondrionopatia cardíaca associada à DOX [3, 5, 6]. Este projecto visa incrementar a colaboração entre o CIAFEL e este excelente laboratório associado, iniciando colaboração com a Universidade de Northern Colorado, USA. Os resultados do presente projecto contribuirão para uma tese de Mestrado e uma de Doutoramento. Adicionalmente, a contratação de um investigador contribuirá para o incremento da formação de recursos humanos.

3.1. Summary (5000 c)

Rational: Doxorubicin (DOX) is a highly effective antibiotic used to treat several types of cancer. Unfortunately, the clinical use of DOX is limited by the occurrence of a dose-related cardiac toxicity that results in life-threatening cardiomyopathy. It has been described that DOX-induced cardiomyocyte dysfunction is associated with increased levels of oxidative damage and apoptosis, with the involvement of mitochondrial alterations. Many preventive and therapeutic strategies have been explored to counteract DOX toxicity and dysfunction, such as the antioxidant supplementation and exercise. Our previous works have demonstrated that exercise prevents DOX-induced mitochondrial alterations and apoptotic signaling in rodent

models. However, the mechanisms related to this protection targeting mitochondria remain elusive. In fact, mitochondria have a central role cellular energy production, regulation of pH, calcium homeostasis and cell signaling. One particular aspect of mitochondrial physiology which is very relevant during normal function or during cell death signaling is the mitochondrial permeability transition pore (mtPTP). It has been described that DOX-treatment leads to augmented mtPTP, which is associated with mitochondrial oxidative stress and calcium overload. Nevertheless, the non-pharmacological modulation afforded by exercise against deleterious mtPTP induction in DOX-treated animals was not studied so far, being the central concern of this innovative project

Work hypothesis: The main hypothesis of the present project is that life-span voluntary exercise prevents increased susceptibility of heart mitochondria to mtPTP opening and apoptosis in chronically DOX- treated rats.

Specific aims and methods: Several exercise models have been used with excellent positive outcomes on cardiac hemodynamic parameters, morphological alterations, oxidative damage, apoptosis signaling and mitochondrial function. The explored exercise models include forced acute exercise bout, chronic moderate or low intensity endurance training and life span voluntary running on free wheel. The latter model has more clinical relevance for subjects receiving anti-cancer therapy as it implies low intensity exercise loads and simulates the voluntary habitual physical activity. Because of this, we will use a rodent model of voluntary free wheel running to investigate the potential protection against a sub-chronic DOX treatment (7 weekly injections of 2mg/kg), which is relevant, as it resembles usual chemotherapy protocols.

Male rats will be divided into sedentary, DOX (7 weekly i.p. 2mg/kg DOX-injection), 32wks free wheel and free wheel plus DOX. 24h after the end of physically active period and 1wk after the final injection, animals will be sacrificed and heart

mitochondria isolated for *in vitro* fresh experiments. Classical bioenergetics endpoints (oxygen consumption and membrane potential) as well as cyclosporine A-sensitive mtPTP induction will be investigated. Markers of oxidative damage, apoptosis and antioxidants, will be measured in mitochondria and/or muscle homogenates from the different treatment groups. Protection afforded by exercise against an *in vitro* model for induced mitochondrial oxidative stress (by using the pair iron-hydrogen peroxide) will also be investigated.

Significance of the present work: With the present project, an important contribution to understand the mitochondrial mechanisms associated with decreased cardiac toxicity during anti-cancer therapy will be provided. Depending on the data obtained, a conclusion may be reached that an active life-style before and during DOX treatment prevents negative cardiovascular effects by improving mitochondrial capacity and decreasing aging and thus should likely be advised

Research team: We have been collaborating with research groups at the CNC, University of Coimbra for several years in distinct high quality works regarding the effects of cumulative *in vivo* DOX treatments on mitochondrial function and calcium-induced mtPTP and the protective role of exercise in several rodent models. This project will definitely improve the links between CIAFEL and this high-standard international research associate laboratory. We are also initiating a fruitful collaboration with the University of Northern Colorado, USA which will have a high impact in institutional internationalization. Results from this project will contribute to one Master thesis and one Ph.D thesis. Furthermore, we will hire one research fellow, contributing to the formation of human resources.