UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

### ESTEFANIA SIMOES FERNANDEZ

Alterações do Sistema Nervoso Central associadas à caquexia cancerosa: Estudo de neuroimagem *in vivo* e análises neuropatológicas *post-mortem* em humanos

> São Paulo 2021

### UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

## ESTEFANIA SIMOES FERNANDEZ

Alterações do Sistema Nervoso Central associadas à caquexia cancerosa: Estudo de neuroimagem *in vivo* e análises neuropatológicas *post-mortem* em humanos

> Tese apresentada ao Programa de Biologia Celular, Tecidual e do Desenvolvimento, no Departamento de Biologia de Sistemas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutora em Ciências.

> Área de concentração: Biologia Celular, Tecidual e do Desenvolvimento

Orientadora: Profa. Dra. Marília Cerqueira Leite Seelaender

Versão Original

São Paulo 2021

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP) Serviço de Biblioteca e informação Biomédica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Simoes Fernandez, Estefania Alterações do Sistema Nervoso Central associadas à caquexia cancerosa: Estudo de neuroimagem in vivo e análises neuropatológicas post-mortem em humanos / Estefania Simoes Fernandez; orientadora Marília Cerqueira Leite Seelaender. -- São Paulo, 2021. 164 p. Tese (Doutorado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

Sistema nervoso central. 2. Caquexia. 3.
 Neuroinflamação. 4. Neuroimagem. 5. Neuropatologia.
 Cerqueira Leite Seelaender, Marília, orientador.
 II. Título.

#### UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Estefania Simoes Fernandez

Titulo da Dissertação/Tese: Alterações do Sistema Nervoso Central associadas à caquexia cancerosa: Estudo de neuroimagem *in vivo* e análises neuropatológicas *post-mortem* em humanos

Orientador: Dra Marília Cerqueira Leite Seelaender

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão publica realizada a .................., considerou o(a) candidato(a):

( ) Aprovado(a) ( ) Reprovado(a)

Examinador(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:
Examinador(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:
Examinador(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:
Presidente:	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:



Cidade Universitaria 'Armando de Sales Oliveira', Butarrá, São Paulo, SP – Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000 Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb usp br

São Paulo, 19 de al. " uc.

PARECER 1283/CEPSH CAAE nº 54931116.6.0000.5467

A Comissão de Ética em Pesquisas em Seres Humanos do ICB, nesta data, Aprovou o projeto intitulado: "Alterações hipotalâmicas relacionadas com a síndrome da caquexia associada ao câncer: Análise morfológica e estudo histológico, molecular, celular e sistêmico do sistema nervoso central" dos pesquisadores Profa. Dra. Marilia Cerqueira Leite Seelaender e da aluna Estefânia Simões Fernández.

Cabe aos pesquisadores elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais e final) de acordo com a Resolução nº 466/12, item II, II.19 e II.20, do Conselho Nacional de Saúde, conforme modelo constante no site: www.icb.usp.br. como também finalizar o processo junto à Plataforma Brasil quando do encerramento deste projeto.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em 19/04/2017, bem como anexado uma cópia à Plataforma Brasil.

Atenciosamente,

6

Prof. Dr. PAOLO MARINHO ANDRADE ZANOTTO Coordenador da Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Instituto de Ciências Biomédicas / USP Aprovada pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP, em 10 de fevereiro de 1998.



São Paulo, 23 de março de 2016.

#### Prezados Senhores,

O projeto de pesquisa "Alterações hipotalâmicas relacionadas com a síndrome da caquexia associada ao câncer: Análise morfológica e estudo histológico, molecular, celular e sistêmico do sistema nervoso central", a ser realizado nas dependências do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (HU/USP), cuja pesquisadora responsável é a Profa. Dra. Marília Cerqueira Leite Seelaender, foi considerado exequível pela área Divisão de Clínica Cirúrgica - Pesquisador executante Estefania Simões Fernandez (aluna de Doutorado).

Declaro que esta Chefia e o responsável pelo projeto têm conhecimento dos procedimentos da Universidade de São Paulo no que se refere à excelência científica exigida, às características da revisão anônima por pares e aos termos da Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde.

Esclarecemos que este documento se refere à anuência dada pela área para a possível realização do estudo, o que não autoriza o início da pesquisa, devendo o pesquisador aguardar a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da USP, para tanto.

Atenciosamente,

Dra. Linda Ferreira Maximiano Chefe Técnico Adjunto da Divisão de Clínica Cirúrgica

VERSÃO JULHO/2013

## DECLARAÇÃO

Declaro estar ciente do desenvolvimento do Projeto de Pesquisa intitulado "Alterações hipotalâmicas relacionadas com a síndrome da caquexia associada ao câncer: Análise morfológica e estudo histológico, molecular, celular e sistêmico do sistema nervoso central" coordenado pela Prof(a). Dr(a). Marília Cerqueira Leite Seelaender, vinculado ao Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de São Paulo, em parceria com os pesquisadores do departamento de Cirurgia da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo.

Os pesquisadores envolvidos desenvolverão atividades de pesquisa que contribuirão com grupos existentes e/ou contribuirá com novas linhas de pesquisa de interesse da nossa Instituição.

Dr. Luiz Arnaldo Szutan Chefe do Departamento de Cirurgia da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo

Le Hordo



Universidade de São Paulo Comissão de Ética no Uso de Animais

#### **CERTIFICADO**

Certificamos que a proposta intitulada "Caquexia associada ao câncer: abordagem multiterapêutico", protocolada sob o CEUA nº 8003081117, sob a responsabilidade de **Marilia Cerqueira Leite Seelaender** *e equipe; Estefania Simoes Fernandez* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo) (CEUA-ICB/USP) na reunião de 06/02/2018.

We certify that the proposal "Cancer Cachexia: Multi-therapeutic approach", utilizing 125 Heterogenics rats (125 males), 100 Isogenic rats (100 males), protocol number CEUA 8003081117, under the responsibility of **Marilia Cerqueira Leite Seelaender** and team; Estefania Simoes Fernandez - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Biomedical Sciences Institute (University of São Paulo) (CEUA-ICB/USP) in the meeting of 02/06/2018.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: 48 meses

Depto/Setor: Biologia Celular E do Desenvolvimento

Origem:	Biotério de Produção de Ratos da Rede de Biotérios da USP - Profa. Dra. Zuleica Bruno Fortes					
Espécie:	Ratos heterogênicos	sexo:	Machos	ldade ou peso:	1 a 3 meses	
Linhagem:	Wistar			N amostral:	125	
Origem:	Biotério de Produção de Ratos da Rede de Bio	térios	da USP - Profa. Dra. Z	uleica Bruno Fortes		
Espécie:	Ratos isogênicos	sexo:	Machos	ldade ou peso:	1 a 3 meses	
Linhagem:	Kyoto			N amostral:	100	

São Paulo, 06 de fevereiro de 2018

Luciane Valiria Sita

Profa. Dra. Luciane Valéria Sita Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)

Dr. Alexandre Ceroni Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)

Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III / Cidade Universitária, Butantă - CEP 05508-000 - São Paulo/SP - tel: 55 (11) 3091-7733 HorĂirio de atendimento: 2ª a 6ª das 8 às 16h : e-mail: cep@icb.usp.br CEUA N 8003081117

Quiero dedicar este trabajo a todas las mujeres luchadoras que forman parte de mi vida. En especial a las tres de las que heredé la valentía, el coraje y la fuerza que impulsan mi vida.

ABUELA PEPA, ABUELA PERPETUA Y MAMA

#### AGRADECIMENTOS

Es difícil plasmar en palabras todo el amor y el apoyo recibido durante esta etapa de mi vida. Quiero agradecer al destino que me trajo hasta Brasil y me permitió cumplir este sueño.

A toda mi Familia por haber creído en mí y por apoyarme incondicionalmente, por mucho que doliese mi partida. Muchas gracias, en especial Papa, Mama, Álex, Abuela, Tía Ema y Edu.

Joanna, obrigada por ter sido meu porto seguro junto com o Snow. Por ter acompanhado e aguentado minhas lutas e meus momentos ruins, assim como ter comemorado cada vitória e alegria. Durante estes anos, sua admiração, seu respeito e seu carinho foram os maiores motivos pelos quais hoje estou aqui.

Professora Marilia, não tenho palavras suficientes para agradecer tudo o que me deu. Só me resta agradecer por ter acreditado e confiado em mim. Longe da minha família você se tornou uma mãe, uma amiga, uma orientadora e uma suporte importantíssimo para seguir crescendo como aluna, como pesquisadora e como pessoa.

A minha família (não de sangue) que o Brasil me deu. Quero agradecer a todas as pessoas que cruzaram o meu caminho e se tornaram essenciais. Aos maiores presentes em forma de amigos que o Brasil me deu, obrigada por fazerem me sentir em casa. A lista de pessoas incríveis seria imensa, porem gostaria de nomear aquelas que roubaram por completo meu coração:

Andrews, obrigada por ser meu confidente e meu irmão, por todos os momentos que se tornaram histórias que carregarei para sempre no meu coração.

Tales V, você já era importante na minha vida desde o começo desta etapa, mas esta pandemia me mostrou ainda mais a pessoa maravilhosa que você é. Obrigada por cuidar de mim nesta loucura, por segurar as pontas e enlouquecer comigo.

Jimena, mi española-brasileña, gracias por estar a mi lado. Llegaste por sorpresa y me recordaste que valía la pena seguir, hasta en los peores momentos de esta etapa. Gracias por tu apoyo incondicional y por traer felicidad a mi vida. Eres el pedacito de España que necesitaba encontrar en Brasil.

Analía, gracias por convertirte en mi hermana, mi amiga y mi ejemplo a seguir. Durante estos años has sido mi refugio y mi mayor consejera. Gracias por estar en los mejores y en los peores momentos.

Fe, o que seria de mim sem você para segurar as minhas loucuras? Obrigada por todas nossas conversas e por ter trazido para minha vida a leveza que eu precisava. Obrigada por ter me acolhido como uma irmã de outras vidas.

Desde España, traje a personas maravillosas que han crecido conmigo y me han acompañado en todas mis aventuras. Porque no hay distancia en el mundo que separe una amistad verdadera. Gracias mis A-hores (Albert, Annita, Didi, Charlie, Mire y KelKel), Anna T, Carmen, Mar, Marina, Miriam, Mónica, ... por cuidarme y estar a mi lado a kilómetros de distancia, por creer en mi y por celebrar cada victoria. Teneros en mi vida me hace ser una mejor persona.

A todos os meus companheiros do Lab Caquexia, agradeço o suporte, ajuda e companhia no trabalho diário. Especialmente, Emídio, Silvinho, Dona Emilia e Ivanir. Também, a todos os funcionários do ICB, professores e alunos do meu departamento por tornar meus dias melhores com um simples sorriso.

I would like to thank DeLuca's Lab (Oxford University) and Ewald's lab (University of Virginia). Professor Gabriele and Professor Esiri, it was a pleasure to be part of your group (Adele, Alex, Catherine, Marco and Sydney). Thanks a lot for all the knowledge and care that you gave me.

A todos os pacientes, sem eles nada seria possível. Não tenho palavras para agradecer a participação e a contribuição na minha pesquisa em momentos tão difíceis. Muito obrigada, vocês são os heróis desta história!

A todos os colaboradores pela contribuição e suporte: Professor Pinhata, Dr. Paulo Sérgio Martins, Professor Geraldo Busatto Filho e equipe (Fabio, Jullie, Naomi), Dr. Ricardo Riyoiti Uchida, Dra. Mariana Nucci e Dra. Maria Otaduy.

Obrigada Professora Cássia Mendes Correa, Professor Guillerme Lepski e Professora Alison Colquhoun por aceitarem meu convite para compor esta banca, é um imenso orgulho poder ser avaliada por vocês.

Muito obrigada FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo financiamento do projeto desenvolvido no país (2016/12508-7) e pelo financiamento do estágio no exterior realizado na Universidade de Oxford (2018/24557-8). Agradeço também ao apoio à pesquisa da CAPES e CNPq.

*"Seja a mudança que você quer ver no mundo."* — Mahatma Gandhi

#### RESUMO

Simoes E. Alterações do Sistema Nervoso Central associadas à caquexia cancerosa: Estudo de neuroimagem *in vivo* e análises neuropatológicas *post-mortem* em humanos. 2021. 164f [Tese (Doutorado Direto em Biologia Celular, Tecidual e do Desenvolvimento)] – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

A caquexia é uma síndrome multifatorial e multiorgânica clinicamente desafiadora e associada ao mau prognostico em pacientes com câncer. É caracterizada por inflamação e perda de apetite, e a origem e os mecanismos das alterações que ocorrem nessa doença permanecem ainda desconhecidas. A síndrome leva à desregulação do sistema nervoso central (SNC) e neuroinflamação, com impacto em circuitos neurais que controlam o comportamento alimentar e a composição corporal. O objetivo do presente estudo foi caracterizar simultaneamente a concentração de hormônios, neuropeptídeos e citocinas na circulação periférica. Adicionalmente, avaliou-se a morfologia e funcionalidade do SNC e caracterizou-se a morfologia neuronal e o perfil de células imunes do SNC em pacientes caquéticos. Pacientes com câncer colorretal com caquexia (CC; n = 39) ou sem caquexia (WSC; n = 31) foram recrutados. O conteúdo proteico de citocinas, hormônios e neuropeptídios circulantes foi aferido com a tecnologia Luminex®xMAP ™ e/ou ELISA. O crosstalk central-periférico foi investigado concomitantemente em modelo animal de caquexia, medindo-se o mRNA de neuropeptídios e de receptores no encéfalo (RT-PCR quantitativo). A avaliação do SNC dos pacientes foi realizada empregando-se imagens obtidas em exames de ressonância magnética in vivo (WSC n=12; CC n=10; Philips Achieva Scanner 3 Tesla) e análises neuropatológicas em tecidos postmortem (Control n=10; WSC n=6; CC n=10 software Qupath). Os resultados mostram que pacientes com câncer e caquéticos tinham concentração sérica reduzida dos hormônios [insulina (-25%), leptina (-50%), amilina (-17%), GIP (-46%) e GLP-1 (-26%)] e de neuropeptídeos [β-endorfina (-36%), neurotensina (-36%), oxitocina (-37%), α-MSH (-42%) e MCH (-17%)], relacionados ao controle do apetite em relação aos pacientes de peso estável. O NPY (+28%) e o receptor de leptina (+20%) foram superexpressos no hipotálamo de animais com tumor. Além disso, o SNC humano apresentou diferenças estruturais e funcionais na massa cinzenta (em relação ao dos

pacientes de peso estável) de regiões como núcleo caudado, putâmen, ínsula, córtex orbitofrontal, entre outras (pFWE <0,05). O grupo CC mostrou morfologia neuronal anormal, aumento da densidade neuronal, alteração do perfil da micróglia e dos astrócitos (p <0,05). Em conclusão, estes novos achados mostram que a perda de peso decorrente da caquexia é acompanhada por uma falha na resposta ao conteúdo de hormônios e neuropeptídios na circulação e esta é independente do estado inflamatório. O aumento da expressão de NPY e do receptor de leptina em ratos caquéticos sugere uma resposta compensatória à alteração de sinais periféricos durante a caquexia. Além disso, os resultados indicam que a caquexia compromete a morfologia do SNC, causando principalmente alterações na substância cinzenta dos pacientes caquéticos, levando a alterações nos padrões de volume regional e conectividade funcional; afetando a morfologia neuronal e o perfil da neuroglia. Em conclusão, todas essas alterações podem estar impulsionando a perda de funções homeostáticas, causando um processamento de informação deficiente e levando a alterações metabólicas e comportamentais na caquexia humana. Ao nosso conhecimento, trata-se do primeiro trabalho em fornece a caracterização do cérebro humano em indivíduos caquéticos. As alterações e mecanismos descritos fornecem potencial base para a proposição de tratamentos.

Palavras-chave: Sistema nervoso central. Caquexia. Neuroinflamação. Neuroimagem. Neuropatologia.

#### ABSTRACT

Simoes E. Central nervous system alterations associated with cancer cachexia: *in vivo* neuroimaging and *post-mortem* neuropathological analysis. 2021. 164f [Tese (Doutorado Direto em Biologia Celular, Tecidual e do Desenvolvimento)] – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Cachexia is a clinically challenging multifactorial and multiorgan syndrome, associated with poor outcome in cancer patients, and characterized by inflammation and loss of appetite, and the mechanisms underlying its symptoms have not been fully described. The syndrome leads to central nervous system (CNS) dysregulation and to neuroinflammation, with impact on neural circuits controlling feeding behaviour and body composition. The aim of the present study was to simultaneously characterise the peripheral concentration of hormones, neuropeptides and cytokines. Furthermore, we examined CNS morphology and functionality, neuronal morphology and central immune cell profile in cachectic patients. Colorectal cancer patients with (cachectic cancer- CC; n=39) or without cachexia (weight-stable, WSC; n=31) were enrolled. The protein content of circulating cytokines, hormones and neuropeptides was measured with Luminex®xMAP<sup>™</sup> technology and/or ELISA. Central-peripheral crosstalk was concomitantly investigated in a rodent model of cachexia, by measuring neuropeptide and brain receptor mRNA (quantitative RT-PCR). The evaluation of the changes affecting the CNS was performed using *in vivo* structural magnetic resonance imaging (Philips Achieva Scanner 3 Tesla) and post-mortem neuropathological analyses (Qupath Software). The results show that cachectic cancer patients present reduced concentration of circulating appetite control-related hormones [insulin (-25%), leptin (-50%), amylin (-17%), GIP (-46%) and GLP-1 (-26%)], and of neuropeptides [β-Endorphin (-36%), neurotensin (-36%), oxytocin (-37%), α-MSH (-42%) and MCH (-17%)] in comparison with WSC. The expression of NPY (+28%) and of Leptin receptor (+20%) was increased in the hypothalamus of tumour-bearing animals. Furthermore, the human CNS presented structural and functional differences in the gray matter (GM) of the regions such as the caudate nucleus, putamen, insula, orbitofrontal cortex, among others (pFWE <0.05). Also, CC showed abnormal neuronal morphology, neuronal density, microglia/macrophage burden and astrocyte profile disruption (p <0.05). In conclusion, these novel findings show that wasting in cachexia is accompanied by disrupted counterregulatory capacity, as the adaptive changes in circulating hormones and neuropeptides occurring in WSC in response to cancer, fail in CC to bear correlation with the inflammatory status. The increased expression of NPY and leptin receptors in the cachectic rats may suggest a compensatory response to decreased signal input during cachexia. The results indicate that cachexia compromises CNS morphology mostly causing changes in GM of cachectic patients, leading to alterations in regional volume patterns, functional connectivity, neuronal morphology and neuroglia profile disruptions that may all contribute to the loss of homeostatic function control and to deficient information processing, as well as to metabolic and behavioural derangements in human cachexia. To our knowledge, this is the first study to provide the characterization of the cachectic human brain. The findings contribute to the basis for potential proposition of therapeutic strategies in cancer cachexia.

Keywords: Central nervous system. Cachexia. Neuroinflammation. Neuroimaging. Neuropathology.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação dos critérios de diagnóstico da caquexia
Figura 2. Estágios da caquexia associada ao câncer
Figura 3. Alterações multiorgânicas associadas a caquexia cancerosa
Figura 4. Interação entre o SNC e os órgãos periféricos na caquexia cancerosa 40
Figura 5. Protocolo de processamento pela VBM otimizada-DARTEL
Figura 6. Protocolo de processamento para DTI57
Figura 7. Espectro típico obtido pela MRS na região do hipotálamo em um paciente 58
Figura 8. Ilustração esquemática do pré-processamento padrão em CONN 60
Figura 9. Sampling das áreas de interesse no cérebro humano
Figura 10. Quantificado automatizada das regiões de interesse no Qupath v.0.1.265
Figura 11. Prognosticadores de doenças inflamatórias72
Figura 12. Conteúdo de citocinas e quimiocinas nas amostras de soro humano 73
Figura 13. Conteúdo de hormônios nas amostras de soro humano
Figura 14. Conteúdo de neuropeptídios nas amostras de soro humano
Figura 15. Análise de correlação de proteínas circulantes em pacientes WSC e CC
Figura 16. Região do córtex orbitofrontal com aumento de volume da substância cinzenta em pacientes caquéticos
Figura 17. Região do caudado com aumento de volume da substância cinzenta em pacientes caquéticos
Figura 18. Região do putâmen esquerdo com aumento de volume da substância cinzenta em pacientes caquéticos
<b>Figura 19.</b> Região da ínsula direita com diminuição de volume da substância cinzenta em pacientes caquéticos
<b>Figura 20.</b> Região do giro temporal direito com diminuição de volume da substância cinzenta em pacientes caquéticos

Figura 21. Análise de correlação entre o volume dos ROIs e os dados antropométricos, fatores bioquímicos e marcadores inflamatórios circulantes em pacientes WSC e CC
Figura 22. Alterações da FC nas análises ROI-to-ROI em pacientes com caquexia
Figura 23. Análise qualitativa da morfologia dos neurônios
Figura 24. Testes post-hoc entre os grupos para a densidade neuronal
Figura 25. Razão CD68/Iba1 no caudado dos grupos estudados 100
Figura 26. Análise qualitativa dos astrócitos GFAP+ nas regiões perivasculares . 101
Figura 27. Marcação GFAP com diferença estatística nas ROI específicas 102
Figura 28. Análise semi-quantitativa da via mTOR105
Figura 29. Alterações da via do mTOR na caquexia cancerosa
Figura 30. Alterações do Sistema Nervoso Central associadas a caquexia cancerosa

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lista de fatores analisados por ensaio de Luminex®	49
Tabela 2. Lista de primers para modelos animais	53
Tabela 3. Lista de padronização dos anticorpos	64
Tabela 4. Algoritmos Qupath para quantificação	65
Tabela 5. Características gerais dos pacientes	70
Tabela 6. Avaliações de peso corporal e ingestão alimentar dos animais	76
Tabela 7. Expressão gênica no hipotálamo dos animais	76
Tabela 8. Dados dos volumes totais cerebrais	82
Tabela 9. ROIs com diferenças de volume da substância cinzenta significativas	83
Tabela 10. Resultados da MRS no hipotálamo de indivíduos WSC e CC	89
Tabela 11. Valores estatísticos das alterações na força de conectividade entreROIs de pacientes caquéticos	as 92
Tabela 12. Características gerais da coorte procedente do Oxford Brain Bank	94
Tabela 13. Densidade neuronal (neurônios/mm²) dos grupos de estudo	97
Tabela 14. Análises quantitativos para mensurar a positividade de Iba1	98
Tabela 15. Análise quantitativa da positividade de CD68	99
Tabela 16. Análises quantitativas da razão CD68/Iba11	00
Tabela 17. Análises quantitativos para mensurar a positividade de GFAP1	01

## ABREVIATURAS

ADAMTS13	Protease de clivagem do fator de von Willebrand		
AH-130	Hepatoma ascítico Yoshida		
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida, do inglês <i>Acquired</i> Immunodeficiency Syndrome		
ASCO	Sociedade Americana de oncologia clínica do inglês, American Society of Clinical Oncology		
CA1	Região CA1 do hipocampo		
CA3	Região CA3 do hipocampo		
CART	Transcrito regulado por cocaína e anfetamina		
CC	Grupo câncer com caquexia do inglês, Cachectic Cancer		
CD68	Cluster de Diferenciação 68		
Cr	Creatina		
BOLD	Nível de Dependência de Oxigenação no Sangue do inglês, <i>Blood Oxygenation Level-Dependent</i>		
DAB	3,3-diaminobenzidina		
DARTEL	do inglês, Diffeormorphic Anatomical Registration Through Exponentiated Lie Algebra		
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica		
DTI	Imagem por tensores de difusão		
ECOG do ingl	ês, Eastern Cooperative Oncology Group		
ELISA	do inglês, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay		
EORTC	Organização Europeia para Pesquisa e Tratamento do Câncer		
EPM	Erro padrão da média		
FA	Anisotropia fraccionada		
FAACT-ESPE	<ul> <li>N Avaliação funcional da anorexia e caquexia - Sociedade Europeia de Nutrição Clínica e Metabolismo</li> </ul>		
FC	Força de conectividade		
FDR	Taxa de descoberta falsa		
FOV	Campo de visão do inglês, <i>field of view</i>		
FWE	do inglês, <i>family-wise error</i>		
FWHM	do inglês, <i>full-width at half-maximum</i>		
GFAP	Proteína glial fribrilar ácida		
GIP	Peptídeo inibidor gástrico		
GLP-1	Peptídeo semelhante ao glucagon-1		
GLP-1R	Receptor do peptídeo semelhante ao glucagon-1		
Glu	Glutamato		

Glx	Soma de glutamato e glutamina
GPC	Glicerofosfocolina
Hb	Hemoglobina
H&E	Hematoxilina e eosina
lba1	Molécula adaptadora ligante de cálcio ionizado-1
IFNγ	Interferon gama
IL-	Interleucina
IMC	Índice de massa corporal
i.p.	Inóculo intraperitoneal
LCR	Líquido cefalorraquidiano
LMF	Fator de mobilização de lipídeos
MC	Massa corporal
MCH	Hormônio concentrador de melanina
MCP1/CCL2	Proteína quimioatraente de monócitos 1
ml	Mioinositol
MIP-1a/CCL3	Proteína inflamatória dos macrófagos -1α
MIP-1β/CCL4	Proteína inflamatória dos macrófagos -1β
mL	Mililitros
MRS	Espectroscopia de ressonância magnética
α-MSH	Hormônio estimulante de alfa-melanócitos
mTOR	Alvo mecanístico da rapamicina
MNI	Instituto Neurológico de Montreal
MPO	Mieloperoxidase
NAA	N-acetilaspartato
NEX	Número de excitações
NGAL	Lipocalina Associada à Gelatinase Neutrofílica
NPY	Neuropeptídeo Y
NPY/AgRP	Neuropeptídeo Y e proteína relacionada a agouti
NPY R	Receptor de Neuropeptídio Y
OD	Densidade óptica.
Ob Rb	Receptor de Leptina
PBS	Tampão fosfato-salino do inglês, Phosphate-buffered saline
PCh	Fosfocolina
PCR	Proteína C-reativa
pg/mL	Picogramas por mililitro
PIF	Fator indutor de proteólise
PMI	Intervalo pós-morte

pmTOR	mTOR fosforilada		
POMC	Pro-opiomelanocortina		
POMC/CART	Pró-opiomelanocortina e transcrito regulado por cocaína e anfetamina, anorexigênicos		
PP	Polipeptídeo pancreático		
PRESS	Técnica PRESS do inglês, Point Resolved single voxel		
pS6K	s6K fosforilada		
PYY	Peptídeo tirosina tirosina		
QLQ-C30	Avaliação da qualidade de vida		
RMI	Imagem por ressonância magnética		
ROI	Região de interesse do inglês, region of interest		
rs-fMRI	Ressonância magnética funcional em repouso do inglês, resting state fRMI		
RT	Temperatura ambiente do inglês, Room temperature		
RT-PCR	Reação em cadeia polimerase em tempo real		
SAA	Proteína amilóide A sérica		
SB	Substância branca		
SC	Substância cinzenta		
S6K	Proteína ribossomal S6 quinase		
SNC	Sistema nervoso central		
sVCAM	Molécula de adesão da célula vascular solúvel		
TBSS	do inglês, Tract Based Spatial Statistics		
TBS-T	Tampão tris-salino tween do inglês, Tris Buffered Saline with Tween		
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido		
TE	Tempo de eco		
TGFβ	Fator de crescimento transformador-β		
ΤΝFα	Fator de necrose tumoral alfa		
TR	Tempo de repetição		
TSC1	Hamartina		
TSC2	Tuberina		
TV	Tecidual total		
TIV	Tecidual intracraniano total		
VBM	Morfometria baseada no voxel		
WHO	Organização mundial da saúde do inglês, World Health Organization		
WSC	Grupo câncer sem caquexia do inglês, Weight Stable Cancer		

## Sumário

1.	INT	RODUÇÃO	27
2.	RE\	/ISÃO BIBLIOGRÁFICA	31
	2.1.	História da caquexia	31
	2.2.	Caquexia: Definição, diagnóstico e estágios da síndrome	33
	2.3.	Fisiopatologia da caquexia	36
	2.4.	Caquexia e Sistema nervoso central (SNC)	39
3.	OB,	JETIVOS	43
	3.1.	Objetivo Geral	43
	3.2.	Objetivos específicos	43
4.	MA	TERIAL E MÉTODOS	45
	4.1.	Delineamento experimental geral	45
	4.2.	Ética em pesquisa humana	45
	4.3.	Recrutamento dos pacientes e avaliação clínica	46
	4.4.	Coleta de sangue	47
	4.5.	Avaliação de parâmetros clínicos e Análises bioquímicas	47
	4.6.	Diagnóstico da caquexia	47
	4.7.	Grupos experimentais	48
	4.8.	Determinação da expressão proteica por ensaio Luminex®	48
	4.9. <i>Immu</i>	Determinação da expressão proteica por ensaio <i>Enzyme-Link</i> nosorbent Assay (ELISA)	ed 50
	4.9.	1 Técnica ELISA sanduíche	50
	4.9.	2 Técnica ELISA por competição	51
	4.10.	Ética em pesquisa em modelo animal	52
	4.11.	Animais	52
	4.12.	Desenho Experimental e inoculação do tumor	52
	4.13.	Análise de expressão gênica	52
	4.14.	Aquisição de imagens por ressonância magnética (RMI)	54
	4.14	4.1 Processamento das imagens pela morfometria baseada no voxel (VB	M) 55
	4.14	4.2 Processamento das imagens por tensores de difusão (DTI)	56
	4.14 hipo	4.3 Processamento das imagens de espectroscopia (MRS) focalizadas otálamo	no 57
	4.14 repo	4.4 Processamento das imagens de Ressonância magnética funcional e buso ( <i>resting state</i> fRM, rs-fMRI)	em 58
	4.15.	Coleta de cérebro humano post-mortem	61
	4.16.	Preparação de tecido e obtenção de amostras (do inglês, sampling)	61

	4.17.	7. Histologia básica na neuropatologia		62
	4.18.	Imu	nohistoquímica (IHQ)	62
	4.19.	Aqu	iisição de imagens	64
	4.20.	Aná	lise das regiões de interesse	65
	4.20	).1	Análise quantitativa	66
	4.20	).2	Análise semi-quantitativa	66
	4.21.	Aná	lise estatística	66
5.	RES	SULT	TADOS	69
	5.1.	Dad	los clínicos	69
	5.2.	Aná	lise da expressão proteica	72
	5.2.	1	Resposta inflamatória em pacientes caquéticos	72
	5.2.	2	Mudanças no perfil hormonal sistêmico decorrentes da caquexia	73
	5.2. caq	3 uexia	Alterações do conteúdo de neuropeptídios circulantes associadas a	; à 74
	5.3.	Car	acterísticas gerais dos animais	75
	5.4.	Aná	lise da expressão gênica por meio de RT-PCR	76
	5.4. hipo	1 otálar	Expressão gênica de neuropeptídios e receptores hormonais mo de rato	no 76
	5.5.	Rela	ação entre parâmetros clínicos e mediadores circulantes na caquexia	77
	5.6.	Aná	lise de imagens por ressonância magnética (RMI)	81
	5.6. cere	1 ebral	Morfometria baseada no voxel (VBM) – Diferenças de volume to	otal 81
	5.6. inte	2 resse	VBM - Diferenças de volume da substância cinzenta nas regiões e (ROIs)	de 83
	5.6. inte	3 resse	VBM - Diferenças de volume da substância branca nas regiões e (ROIs)	de 89
	5.6. anis	4 sotroj	Imagem por tensores de difusão (DTI) - Diferenças nos valores pia fracionada	da 89
	5.6.	5	Imagens de espectroscopia (MRS) focalizadas no hipotálamo	89
	5.6. stat	6 e fRI	Resting state Ressonância magnética funcional em repouso ( <i>rest</i> VI):	ing 90
	5.7.	Car	acterísticas gerais dos pacientes – Coorte Oxford Brain Bank	94
	5.8.	Aná	lises neuropatológicas	95
	5.8.	1	Morfologia neuronal e densidade neuronal	95
	5.9.	Perf	fil das células da neuróglia	98
	5.9.	1	Quantificação de micróglia/macrófagos por meio de imunohistoquími	ca 98
	5.9.	2	Quantificação dos astrócitos por meio de imunohistoquímica 1	01
	5.10.	Aná	lise semi-quantitativa da via mTOR nas ROI1	03

6.	. DIS	CUSSÃO107
7.	. co	NCLUSÃO
8.	. REF	FERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS127
9.	. APÉ	ÊNDICES
	9.1. mTOF	APÊNDICE A – Escalas para quantificação semi-quantitativa da via do
	9.2. bioquí	APÊNDICE B – Correlações entre medidas antropométricas e parâmetros micos em WSC e CC
	9.3.	APÊNDICE C – Correlações entre citocinas em pacientes WSC e CC 144
	9.4.	APÊNDICE D – Correlações entre hormônios em pacientes WSC e CC 145
	9.5.	APÊNDICE E – Correlações entre neuropeptídios em pacientes WSC e CC 
	9.6. bioquí	APÊNDICE F – Correlações de medidas antropométricas, parâmetros micos e marcadores circulantes em pacientes WSC e CC
	9.7. CC	APÊNDICE G – Análise global da substância cinzenta em pacientes WSC e
	9.8. CC	APÊNDICE H – Análise global da substância branca em pacientes WSC e
	9.9. valore	APÊNDICE I – Imagem por tensores de difusão (DTI) - Diferenças nos s da anisotropia fracionada151
	9.10. <i>brain</i> 1	APÊNDICE J – Relatórios clínicos originais da coorte procedente do Oxford bank
	9.11.	APÊNDICE K – Marcação Iba1 nas ROI específicas
	9.12.	APÊNDICE L – Marcação CD68 nas ROI específicas
	9.13.	APÊNDICE M – Marcação GFAP nas ROI específicas
	9.14. no ext	APÊNDICE N – Estudo realizado na doença de Alzheimer durante o estágio erior (BEPE)
1(	0. ANI	EXOS159
	10.1.	ANEXO A – Termo de consentimento livre e esclarecido159
	10.2. da cao	ANEXO B – Ferramenta de Excel® (Office 2021) utilizada para diagnostico quexia

## Introdução

#### 1. INTRODUÇÃO

A caquexia é uma síndrome metabólica complexa, multifatorial e multiorgânica que se caracteriza pela perda involuntária de peso, definida por uma perda contínua de massa muscular esquelética (com ou sem perda de tecido adiposo) (EVANS et al., 2008; FEARON et al., 2011; BARACOS; MAZURAK; BHULLAR, 2019). Considerando o quadro clínico dos pacientes, a perda de massa corporal vem acompanhada principalmente pela presença de inflamação sistêmica, anorexia, astenia, fadiga, resistência a insulina e imunossupressão (BLUM et al., 2011; PORPORATO, 2016; WYART et al., 2020). Em adição, a síndrome da caquexia encontra-se associada a diversas doenças subjacentes, tais como, AIDS (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida, do inglês *Acquired Immunodeficiency Syndrome*), insuficiência cardíaca, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) tuberculose, esclerose múltipla e câncer. (TISDALE, 2002; FARKAS et al., 2013; BARACOS et al., 2018).

Dentre todas as doenças, a caquexia associada ao câncer apresenta a prevalência mais elevada (50-80%), a síndrome está presente em mais de dois terços dos pacientes com câncer avançado, e é diretamente responsável pelo óbito de 20% a 40% de todos os pacientes. (WARREN, 1932; WATCHORN et al., 2001; VON HAEHLING; ANKER, 2014). Entretanto, sua incidência varia entre os diferentes tipos de câncer, sendo: 80.6% no câncer hepático, 75,1% no câncer de pulmão, 67,7% no câncer pancreático, 64,3% no câncer esofágico ou 62,3% no câncer gastrointestinal, entre outros (MUSCARITOLI et al., 2017; BARACOS et al., 2018). Em 2020, segundo organização mundial da saúde (WHO do inglês, *World Health Organization*), o câncer foi responsável por quase 10 milhões de mortes, das quais a metade foram atribuídas aos tipos de câncer mais frequentemente associados à caquexia [pulmonares (1,8 milhões)] (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020). Apesar disso, até o presente momento a síndrome da caquexia associada ao câncer não foi incluída, listada ou considerada como causa de morte nas estatísticas de câncer em nenhum país.

Clinicamente, a caquexia associada ao câncer é uma síndrome desafiadora que leva ao comprometimento funcional progressivo, afeta negativamente a qualidade de vida, aumenta a morbidade e mortalidade, compromete as abordagens terapêuticas e leva a um prognóstico adverso (FEARON et al., 2006; BACHMANN et al., 2008; FEARON, 2008). Nas últimas décadas diversos estudos tentaram mostrar possíveis opções de tratamento: nutrição enteral ou parenteral; suplementos nutricionais (e.g. omega-3 ou L-carnitinia); uso de fármacos (e.g. acetato de megestrol, canabinoides ou corticosteroides); ou exercício físico, sendo este o que apresentou melhores resultados (LIRA et al., 2015; ARENDS et al., 2017; SADEGHI et al., 2018; NI; ZHANG, 2020). Roeland et al em 2020 criaram as diretrizes ASCO (do inglês, American Society of Clinical Oncology), para fornecer orientação sobre como tratar pacientes caquéticos adultos com câncer avançado na clínica, baseada em uma revisão sistemática da literatura (ROELAND et al., 2020). A guia ASCO mostra a efetividade de varias intervenções e ensaios clínicos com o intuito de criar uma abordagem terapêutica consensuada, assim como demostra a importância de tratamentos multimodais tendo em vista que a síndrome não pode ser totalmente revertida exclusivamente por suporte nutricional convencional (ROELAND et al., 2020). Não obstante, infelizmente na prática clínica, a caquexia habitualmente não é tratada até que o paciente sofre fragueza e perda exacerbada de peso, ponto em que a síndrome é quase irreversível (BARACOS; MAZURAK; BHULLAR, 2019; ROELAND et al., 2020).

A nível fisiopatológico a síndrome da caquexia associada ao câncer é uma desordem impulsionada pela combinação de vários fatores tais como: inflamação sistémica, alterações metabólicas, excesso de catabolismo e distúrbios no balanço energético (caraterizado pela redução da ingestão alimentar e um aumento do gasto energético basal, o que gera um balanço energético negativo e redução da eficiência termodinâmica levando a perda de peso corporal) (ARGILÉS et al., 2014a; BARACOS et al., 2018; WYART et al., 2020). Acredita-se que as alterações metabólicas são desencadeadas pela produção dos próprios fatores tumorais, fatores do hospedeiro e também pela interação entre eles, afetando todos os órgãos e compartimentos do organismo (BLUM et al., 2011; PORPORATO, 2016). Estudos já mostraram varias alterações no tecido muscular esquelético, no tecido adiposo, no microambiente tumoral, no fígado, no trato gastrointestinal e no cérebro, entre outros (DE MATOS-NETO et al., 2015; NEVES et al., 2016; LIMA et al., 2019; BURFEIND et al., 2020b).

Tendo em consideração o papel do Sistema Nervoso Central (SNC) na caquexia, o SNC orquestra uma complexa integração de sinais das vias periféricas,

como citocinas e hormônios, respondendo por meio da liberação de neuropeptídeos específicos e modula as vias neuroendócrinas, a composição corporal e o equilíbrio energético (MONDELLO et al., 2014; MOLFINO et al., 2015). Durante a caquexia, foi demostrado em modelo animal que ocorre neuroinflamação afetando os circuitos neurais que controlam o comportamento alimentar e regulam a homeostase energética (LAVIANO et al., 2008a; BURFEIND; MICHAELIS; MARKS, 2016). Em adição, durante a inflamação sistêmica, os marcadores inflamatórios detectados pelo SNC ativam e sensibilizam constantemente a neuroglia e as células imunes infiltrantes do SNC, o que perpetua a neuroinflamação e contribui a diversos distúrbios do SNC (DISABATO; QUAN; GODBOUT, 2016; KORZHEVSKII; KIRIK, 2016; BURFEIND et al., 2020a).

Desse modo, alterações de áreas cerebrais relacionadas com a homeostase energética e ingestão alimentar, assim como o *crosstalk* entre o SNC e os órgãos periféricos podem estar desempenhando um papel importante na patogênese da caquexia, porem os dados ainda são pioneiros e com isso, necessita de uma investigação mais aprofundada (LAVIANO et al., 2012; BURFEIND et al., 2020b). De fato, a literatura surpreendentemente carece de estudos experimentais sobre a regulação em detalhe do SNC na caquexia do câncer (uma pesquisa PubMed apenas recupera 22 estudos, 19 com modelos animais ou celulares, e apenas 3 com pacientes). Nesse cenário, nosso grupo teve a possibilidade de realizar o primeiro estudo de neuroimagem *in vivo* e neuropatológico *post-mortem* em pacientes com câncer e caquexia, com o objetivo de compreender o cérebro caquético humano e verificar possíveis alterações cerebrais relacionadas com a síndrome da caquexia.

# Revisão Bibliográfica

#### 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 2.1. História da caquexia<sup>1</sup>

Os primeiros relatos que se encontram sobre a caquexia, sem o uso do termo específico porem que descrevem uma doença que leva a problemas gerais de saúde e desnutrição, perda de massa corporal e fraqueza, remontam a escrituras bíblicas há mais de 3500 anos (BENNANI-BAITI; WALSH, 2009). No livro de Salmos o Rei David, que foi o segundo monarca do reino unificado de Israel, queixa-se da sua condição física dizendo:

*"I forgot to eat my bread"* – "Esqueço até de comer o meu pão" (Salmo 102:4)

*"My bones cleave to my skin" – "*Meus ossos aderem à minha pele" (Salmo 102:5)

*"My knees are weak through fasting; and my flesh failed of fatness" – "*Os meus joelhos estão enfraquecidos pelo jejum; e a minha carne emagrece" (Salmo 109:24)

Os versos citados mostram que o Rei David sofria um distúrbio alimentar e apresentava sintomas compatíveis com a caquexia, tais como perda de apetite (anorexia) e fraqueza decorrentes da extrema perda de peso involuntária (BEN-NOUN, 2004).

*A posteriori*, aproximadamente há 2400 anos na Grécia antiga, encontramos a origem da palavra caquexia que derivada do grego, *kakos (mau)* e *hexis (estado).* Também, aparecem os primeiros relatórios médicos feitos por Hipócrates (460-377 aC) na ilha de Cos (KATZ; KATZ, 1962):

> "The flesh is consumed and becomes water... the abdomen fills with water, the feet and legs swell, the shoulders, clavicles, chest and thighs melt away... This illness is fatal" – "A carne é consumida e se torna água...o abdômen se enche de água, os pés e as pernas incham, os ombros, clavículas, tórax e coxas derretem...esta doença é fatal".

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Todas as citações presentes no item 1.1 foram traduzidas ao português pela autora

Hipócrates observou como a síndrome leva ao esmaecimento do corpo, e a associou com o mal prognóstico (PITTMAN; COHEN, 1964; DOEHNER; ANKER, 2002).

No entanto, após os relatos de Hipócrates não se encontram novos registros clínicos até 1858, quando o médico inglês John Zachariah Laurence relacionou por primeira vez a caquexia com uma doença subjacente como o câncer:

"... exhausting sweats, derangement of the digestive organs, and a peculiar waxy tint of the countenance, form together the principal elements of the so-called cancerous cachexia..." – "Suores exaustivos, perturbação dos órgãos digestivos e uma peculiar tonalidade cerosa do semblante, formam juntos os principais elementos da chamada caquexia cancerosa" (LAURENCE, 1858).

Também, em 1860 o médico francês Charles Mauriac associou a síndrome com a doença cardíaca:

"commonly observed secondary phenomenon in patients affected with diseases of the heart...a peculiar state of cachexia which is...conventionally designated cardiac cachexia" – "Fenômeno secundário comumente observado em pacientes afetados com doenças do coração...um estado peculiar de caquexia que é... convencionalmente designada como caquexia cardíaca" (MAURIAC, 1860).

No século XX, foi o americano William Osler que associou a síndrome ao câncer, à tuberculose, malária e sífilis. Considerou como sintomas essenciais o emagrecimento, a perda de força, a anorexia e anemia:

"Progressive emaciation is one of the most constant features... Loss in strength is usually proportionate to the loss in weight... Anemia is present in a large proportion... and with emaciation gives the picture of cachexia... Anorexia, loss of desire for food, is a frequent and valuable symptom, more constant perhaps than any other" – "Emagrecimento progressivo é uma das características mais constantes ...a perda de força geralmente é proporcional à perda de peso... a anemia está presente em grande proporção...e com emagrecimento atinge-se o aspecto de caquexia...anorexia, perda de desejo por comida, é um sintoma frequente e valioso, talvez mais constante do que qualquer outro" (OSLER, 1901).

Em seguida, em 1915 encontramos o mais extenso relato do século XX sobre a caquexia associada ao câncer. Howard Canning Taylor, fundador da Sociedade Americana para o controle do câncer, escreveu um capítulo de livro reconhecendo a importância clinica da síndrome, esclarecendo que a prevalência depende do tipo de tumor e descrevendo a síndrome como progressiva e variável (TAYLOR, 1901).

Embora a caquexia seja observada há milhares de anos, sua etiologia permanece desconhecida o que a torna uma síndrome desafiadora, tanto na prática clínica, quando na investigação. No século XXI, inúmeras características fisiopatológicas da síndrome foram elucidadas, no entanto, habitualmente esses achados não são considerados na prática clínica. A definição e classificação da caquexia precisam ser atualizadas, e a síndrome carece de uma abordagem terapêutica amplamente aceita (EVANS et al., 2008; FEARON et al., 2011; BARACOS; MAZURAK; BHULLAR, 2019; ROELAND et al., 2020).

2.2. Caquexia: Definição, diagnóstico e estágios da síndrome

A caquexia é uma palavra derivada do grego, *kakos* e *hexis*, que significa "mau estado". A caquexia se define como uma síndrome metabólica multifatorial caracterizada pela continua perda de massa muscular esquelética de forma involuntária (com ou sem perda de tecido adiposo) levando a um progressivo comprometimento funcional (EVANS et al., 2008; FEARON et al., 2011; BARACOS; MAZURAK; BHULLAR, 2019). Os principais sintomas associados à síndrome incluem a inflamação sistêmica, resistência à insulina, astenia, anorexia, anemia e fadiga, que em conjunto, contribuem para a diminuição da qualidade de vida do paciente, levando ao mau prognostico e menor sobrevida (TEUNISSEN et al., 2007; AOYAGI et al., 2015; NI; ZHANG, 2020).

Nas últimas décadas, as definições da caquexia foram alteradas e evoluíram; contudo, os critérios exatos usados para definir a caquexia não são consistentes entre os estudos. Em 2008, um consenso internacional publicou uma tentativa de definição da síndrome (sem especificar a doença subjacente associada) ora amplamente aceita: *"A caquexia é uma síndrome metabólica complexa associada a uma doença subjacente e se caracteriza principalmente pela perda de massa muscular, com ou sem perda de massa gorda. [...]"* (EVANS et al., 2008). Em adição, estipularam os critérios de diagnóstico da caquexia (Figura 1), nos quais considera-se a presença da involuntária perda de peso corporal de pelo menos 5% do peso habitual ou índice de massa corporal (IMC) menor de 20kg/m<sup>2</sup> nos últimos 12 meses, assim como a

presença de três dos cinco parâmetros adicionais listados a seguir: (I) perda de massa muscular; (II) fadiga; (III) anorexia; (IV) diminuição da massa magra; (V) alterações nos padrões bioquímicos que incluem aumento de marcadores inflamatórios, como a proteína C-reativa (>5,0 mg/L) e interleucina-6 (IL-6; >4,0 pg/mL), concentração de hemoglobina menor do que 12g/dL e de albumina sérica abaixo de 3,2g/dL (EVANS et al., 2008).



**Figura 1.** Representação dos critérios de diagnóstico da caquexia (Fonte: adaptado ao português de EVANS et al., 2008)

Em 2009, o grupo italiano SCRINIO definiu a caquexia especificamente associada ao câncer como perda de peso superior ou igual a 10%, acompanhada de pelo menos um dos seguintes sintomas: anorexia, saciedade precoce e fadiga (BOZZETTI; MARIANI, 2009).

Tendo em vista a dificuldade em diferenciar entre anorexia e outros fatores que levam à perda de peso, em 2011 um novo consenso internacional propôs a seguinte definição: "*A caquexia associada ao câncer é uma síndrome multifatorial definida por uma perda contínua de massa muscular esquelética (com ou sem perda de massa gorda) que pode ser parcialmente, mas não totalmente revertida pelo suporte nutricional convencional"* (FEARON et al., 2011). Também, atualizou-se os critérios de diagnóstico: presença de perda de peso corporal de pelo menos 5% nos últimos 6 meses (em ausência de inanição) ou IMC <20kg/m<sup>2</sup> e qualquer grau de perda de peso> 2%; ou sarcopenia (mensurada pelo índice de massa muscular esquelética apendicular: masculino <7,26kg/m<sup>2</sup>; feminino <5,45kg m<sup>2</sup>) e qualquer grau de perda

estágios de relevância clínica: pré-caquexia, caquexia e caquexia refratária (Figura 2). Segundo os autores, a pré-caquexia é caracterizada pela perda de pelo menos 5% do peso, anorexia e alterações metabólicas. O estágio de caquexia é definido pela perda de peso superior a 5%, IMC <20kg/m<sup>2</sup> ou sarcopenia ligada à perda de peso maior que 2%, em paralelo à inflamação sistêmica a redução da ingestão alimentar. Finalmente, no estágio de caquexia refratária, o paciente se torna resistente às terapias antineoplásicas, apresenta um aumento do catabolismo e baixo *score* de desempenho, não sendo possível reverter-se o quadro e acarretando uma expectativa de vida inferior a 3 meses (FEARON et al., 2011).

	Precaquexia	Caquexia	Caquexia Refratária
NORMAL			MORTE
	<ul> <li>Perda de peso &lt;5%</li> <li>Anorexia e alterações metabólicas</li> </ul>	<ul> <li>Perda de peso &gt;5%; ou IMC&lt;20 Kg/m<sup>2</sup> e perda de peso &gt;2%; ou sarcopenia e perda de &gt;2%</li> <li>Redução da ingestão alimentar</li> <li>Inflamação sistêmica</li> </ul>	<ul> <li>Catabolismo</li> <li>Não responsivo ao tratamento anticâncer</li> <li>Baixo score de desempenho</li> <li>Expectativa de vida &lt; 3 meses</li> </ul>

**Figura 2.** Estágios da caquexia associada ao câncer (Fonte: adaptado de FEARON et al., 2011).

A comunidade científica e as sociedades de estudo da caquexia mostraram interesse em atualizar a definição, os critérios de diagnóstico, assim como debateram a possibilidade de acrescentar novos biomarcadores e técnicas mais precisas para identificar a perda de massa corporal (FEARON; ARENDS; BARACOS, 2013; EBADI; MAZURAK, 2015; BARACOS et al., 2018; WYART et al., 2020). Entretanto, a caquexia é um efeito adverso ao câncer cuja complexidade dificulta a estipulação de critérios de diagnóstico uniforme, tornando difícil a aplicação prática dos conhecimentos e comprometendo o tratamento e dessa forma, o prognóstico do paciente.

#### 2.3. Fisiopatologia da caquexia

A caquexia é um distúrbio metabólico caracterizado por apresentar um balanço energético e proteico negativo, causado principalmente por uma diminuição da ingestão alimentar, excesso de catabolismo, redução do anabolismo e inflamação (FEARON et al., 2011; ARGILÉS et al., 2014a; SEELAENDER et al., 2015; BARACOS et al., 2018).

Um dos componentes principais que contribuem para a perda de peso corporal característica da caquexia é o desequilíbrio no balanço energético, que ocorre quando há uma ingestão calórica reduzida (maioritariamente causada pela anorexia) e um aumento do gasto energético total, levando à ineficiência termodinâmica (FEARON; ARENDS; BARACOS, 2013; PETRUZZELLI; WAGNER, 2016). Em adição, a ineficiência energética também é atribuída à presença de má absorção intestinal (MUSCARITOLI et al., 2017). A absorção alterada de nutrientes como lipídeos e carboidratos leva a uma menor secreção de hormônios anabólicos, aumento do catabolismo e gera depleção do músculo e gordura de forma insustentável para o organismo (SUZUKI et al., 2007; BLUM et al., 2011).

Concomitantemente, fatores produzidos pelo próprio tumor, fatores do hospedeiro e também a interação entre eles agravam a perda de peso, desencadeando um desequilíbrio sistêmico que afeta todos os órgãos e compartimentos do organismo (ARGILÉS et al., 2014b; PORPORATO, 2016) (Figura 3).

Entre os fatores liberados sistemicamente, os que desencadeiam anorexia, hipermetabolismo e alterações neuroendócrinas de forma mais relevante são os mediadores inflamatórios. A resposta inflamatória sistêmica resulta de um aumento na produção de proteínas de fase aguda, como a proteína C reativa (PCR) e/ou fibrinogênio, assim como pelo aumento de citocinas pro-inflamatórias como a IL-1, IL-6 ou fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) (TISDALE, 2010; JAIN; GAUTAM; NASEEM, 2011; DE MATOS-NETO et al., 2015). Estudo recentes mostraram que pacientes caquéticos apresentam alterações na expressão gênica e proteica de citocinas pro-inflamatórias no tumor (DE MATOS-NETO et al., 2015), bem como em
tecidos periféricos, tais como o tecido adiposo e muscular (NEVES et al., 2016; DE CASTRO et al., 2019).

Além das citocinas, outros fatores encontram-se associados à emaciação, tanto do tecido adiposo quanto do músculo esquelético. Fatores derivados do tumor como o fator de mobilização de lipídeos (LMF) e o fator indutor de proteólise (PIF) ou efetores da família do fator de crescimento transformador-β (TGFβ) (como a miostatina) desencadeiam processos catabólicos envolvidos na emaciação (LAVIANO; MUSCARITOLI; FANELLI, 2007; TISDALE, 2007; LIMA et al., 2019).

Nesse contexto, diferentes tipos de mecanismos moleculares, celulares e sistêmicos contribuem para o hipermetabolismo, hipercatabolismo e hipoanabolismo que se observam de forma multiorgânica na síndrome. Entre os tecidos que são alvo de mais estudos encontramos o tecido muscular esquelético, que parece ser um dos principais compartimentos afetados e sofre uma diminuição da síntese e um aumento da degradação proteica, decorrente de uma desregulação em processos tais como, autofagia, apoptose e aumento da atividade da via ubiquitina-proteasoma (AOYAGI et al., 2015; DE CASTRO et al., 2019). No entanto, foram observadas alterações em outros tecidos e órgãos como o tecido adiposo, fígado, trato gastrointestinal, pâncreas e cérebro (como ilustrado na Figura 3) (ARGILÉS et al., 2014b; PORPORATO, 2016).



**Figura 3.** Alterações multiorgânicas associadas a caquexia cancerosa (Fonte: adaptado de PORPORATO, 2016)

Entre os principais órgãos e tecidos afetados ou envolvidos na etiologia da síndrome, o maior desconhecido é o Sistema Nervoso Central (SNC). Tendo em vista a sintomatologia e fisiopatologia da síndrome, nos últimos anos vem ganhando interesse o estudo do SNC e sua associação com a caquexia. Acredita-se que o SNC desempenha um papel essencial na etiologia da síndrome, e em especial o hipotálamo, que é o responsável pelo equilíbrio homeostático de funções sistêmicas vitais como o controle do metabolismo energético global, do apetite, da saciedade, da sede, da regulação osmótica e da regulação térmica (SWAAB et al., 1992; LIN et al., 2011). A compreensão do funcionamento deste importante centro controlador do comportamento alimentar e sua associação com a caquexia, frequentemente acompanhada de anorexia, parece de vital relevância para a melhor compreensão do caos metabólico observado em pacientes caquéticos (MORTON et al., 2006). Desse modo, a literatura atual demonstra que a interação entre o Sistema Nervoso Central (SNC) e os órgãos periféricos pode estar desempenhando importante papel no desenvolvimento da síndrome de caquexia (LAVIANO et al., 2008a; BURFEIND; MICHAELIS; MARKS, 2016).

#### 2.4. Caquexia e Sistema nervoso central (SNC)

O Sistema Nervoso central integra informações cognitivas, visuais e sensoriais, assim como sinais periféricos para regular o balanco energético, controlar a homeostase, o peso corporal e o metabolismo (STRAUB et al., 2010).

Sob condições normais, a homeostase e o balanço energético são controlados pelo hipotálamo, especificamente pelos dois subconjuntos principais de neurônios que o formam: NPY/AgRP (neuropeptídeo Y e proteína relacionada a agouti, orexigênicos) e POMC/CART (Pró-opiomelanocortina e transcrito regulado por cocaína e anfetamina, anorexigênicos) (UETA et al., 2007; LAVIANO et al., 2008b). NPY/AgRP e POMC/CART estão diretamente envolvidos com as seguintes ações: 1) tradução da entrada de informação metabólica e sensorial periférica em uma resposta neuronal, 2) integração das informações provenientes de diferentes tecidos, e 3) desencadeamento das respostas apropriadas (BURFEIND; MICHAELIS; MARKS, 2016).

Também, existem outras regiões cerebrais envolvidas no comportamento alimentar como os gânglios basais ou a amígdala, que estão mais relacionadas com o comportamento hedônico, ou seja, relacionando a ingestão alimentar com prazer ou recompensa (DOUGLASS et al., 2017; KIM et al., 2017; AVERY et al., 2020; LEPPANEN et al., 2020). Mesmo sem estar diretamente relacionadas com o balanço energético, podem ser responsáveis diretos na redução da ingestão alimentar que se observada na caquexia.

Nesse contexto, o SNC integra os sinais provenientes das vias periféricas (Figura 4) como as citocinas e os hormônios, e responde por meio da liberação de neuropeptídios específicos (MONDELLO et al., 2014; MOLFINO et al., 2015). (LAVIANO et al., 2008a; BURFEIND; MICHAELIS; MARKS, 2016). Na caquexia, as populações de neurônios NPY/AgRP e POMC/CART respondem a mediadores inflamatórios sistêmicos, como proteína C reativa (PCR) e citocinas [interleucina-1 (IL-1), IL-6 entre outros], que afetam os circuitos neurais responsáveis em controlar o comportamento alimentar, regular a homeostase energética e podem ter um efeito prejudicial na neurogênese (LAVIANO et al., 2012; SUZUKI et al., 2013; EBADI; MAZURAK, 2015; MOLFINO et al., 2015). Em modelo animal, a concentração intra-

hipotalâmica de TNFα e IL-1 se encontra aumentada em decorrência da inflamação sistêmica que caracteriza a caquexia (BURFEIND; MICHAELIS; MARKS, 2016). Além disso, a neuroinflamação está relacionada com distúrbios no metabolismo, como a indução de proteólise muscular, inibição da ingestão alimentar e perda de peso (BRAUN et al., 2011).





É igualmente importante considerar a resposta do sistema imunológico no SNC em resposta a todos os sinais que integra. Os marcadores inflamatórios detectados pelo SNC ativam e sensibilizam a micróglia, as células imunes inatas do sistema nervoso central e as células imunes infiltradas do SNC que medeiam as respostas neuroinflamatórias (FRANK et al., 2007; KORZHEVSKII; KIRIK, 2016; BURFEIND et al., 2020a). No entanto, a inflamação sistêmica provoca uma constante ativação da neuroglia, levando à perpetuação da neuroinflamação, assim como desregula a resposta imune no nível central e altera o funcionamento do SNC (LAVIANO et al., 2012; DISABATO; QUAN; GODBOUT, 2016). Norden et al. 2016 mostraram que a ativação sequencial da micróglia e dos astrócitos leva a uma transformação do perfil glial, que se torna neurotóxico com potencial fagocitário e com capacidade de liberar mais mediadores pró-inflamatórios, diferentes daqueles implicados nas reações sistêmicas (NORDEN et al., 2016). Nessa perspectiva, os fatores inflamatórios tornaram-se alvos importantes nas estratégias terapêuticas da caquexia com o intuito de melhoram a ingestão alimentar, a composição corporal e a qualidade de vida (REID et al., 2013). No entanto, a modulação de mediadores inflamatórios por si só não é suficiente para proporcionar uma reversão completa da síndrome, sugerindo a participação de outros reguladores (AOYAGI et al., 2015).

Além dos marcadores inflamatórios, o SNC integra sinais do estado nutricional provenientes do tecido adiposo e do trato gastrointestinal, tais como hormônios e neuropeptídios (MORAN, 2009; HOWICK et al., 2017). Os fatores chegam ao SNC cruzando a barreira hematoencefálica e também através da estimulação do nervo vago, induzindo respostas relacionadas à alimentação (LAVIANO et al., 2002; STANLEY et al., 2005). Estudos clássicos e recentes documentaram de forma robusta que os hormônios circulantes influenciam a ingestão de alimentos e o balanço energético, além de contribuir para a fisiologia e metabolismo do músculo e da gordura (REANO; GRAZIANI; FILIGHEDDU, 2014). Três dos principais sinais periféricos endócrinos envolvidos na homeostase metabólica são insulina, leptina e grelina (ASHITANI; MATSUMOTO; NAKAZATO, 2009; TAKAHASHI et al., 2009). Na caquexia, as concentrações de leptina e insulina são de grande interesse por serem diretamente relacionadas com o status de armazenamento de energia (MOEHLECKE et al., 2016). Além disso, vários estudos em roedores demonstraram que a concentração de insulina e a resistência à insulina desempenham um papel na caquexia (O'NEILL et al., 2010). No entanto, outros hormônios anorexígenos, como amilina, glucagon, peptídeo C, peptídeo-1 semelhante ao glucagon (GLP-1), polipeptídeo pancreático (PP) e peptídeo tirosina tirosina (PYY) foram completamente desconsiderados na pesquisa de caquexia do câncer, apesar de estarem envolvidos com o fluxo de nutrientes e homeostase energética em outras condições clínicas (LUTZ, 2012; PERRY; WANG, 2012).

Como um todo, a literatura atual sugere que o SNC seja um dos principais órgãos responsáveis pelas alterações metabólicas, pelo balanço energético negativo e pela perda de peso observadas em pacientes com caquexia, tendo em consideração as inúmeras vias controladas e reguladas pelo cérebro. No entanto, o cérebro caquético humano ainda permanece um grande desconhecido.

# Objetivos

## 3. OBJETIVOS

## 3.1. Objetivo Geral

Verificar possíveis alterações cerebrais relacionadas com a síndrome da caquexia com o uso de técnicas de neuroimagem *in vivo* e com análises neuropatológicas *post-mortem*.

## 3.2. Objetivos específicos

- Avaliar as modificações centrais e sistêmicas na caquexia humana mediante análise do conteúdo circulante de marcadores inflamatórios, hormonais e neuropeptídios de pacientes com câncer;
- Examinar as possíveis modificações de estruturas cerebrais (volume, conectividade e funcionalidade) induzidas pela caquexia associada ao câncer;
- Investigar a morfologia neuronal e o perfil da neuróglia no cérebro humano caquético;
- Avaliar a via do alvo mecanístico da rapamicina (mTOR) no sistema nervoso central na caquexia associada câncer;
- Estabelecer a correlação entre o conteúdo de fatores circulantes periféricos e as possíveis alterações centrais associadas a caquexia.

# Material e Métodos

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

## 4.1. Delineamento experimental geral

Pesquisa em humano	Pesquisa e
Estudo 1 - Análise dos efeitos sistêmicos e periféricos da caquexia	Estudo 2 – Ez neuropeptídio
Determinação da expressão proteica	Inoculação
	<ul> <li>10<sup>8</sup> células</li> </ul>
<ul> <li>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)</li> </ul>	
<ul> <li>ELISA por competição</li> </ul>	Determinação da
- ELISA sanduíche	<ul> <li>Extração de RN.</li> </ul>
Estudo 3 - Avaliação por neuroimagem in vivo do sistema nervoso	<ul> <li>Síntese de cDN/</li> </ul>
central	<ul> <li>Reação em cadeia</li> </ul>
Aquisição de imagens por ressonância magnética (RMI)	
<ul> <li>Morfometria baseada no voxel (VBM)</li> </ul>	
<ul> <li>Imagem por tensores de difusão (DTI)</li> </ul>	
<ul> <li>Espectroscopia focalizada na região do hipotálamo (MRS)</li> </ul>	
<ul> <li>Ressonância magnética funcional em repouso (resting state fRMI)</li> </ul>	
Estudo 4: Análise neuropatológica de tecido cerebral post-mortem	
Histologia básica na neuropatologia - H&E	
<ul> <li>contagens neuronais</li> </ul>	
<ul> <li>densidade neuronal</li> </ul>	
Imunohistoquímica (IHQ)	
<ul> <li>Análise quantitativa</li> </ul>	
- Células da neuróglia (Iba1, CD68 e GFAP)	
<ul> <li>Análise semi-quantitativa</li> </ul>	
- Vía mTOR (TSC1, TSC2, mTOR, pmTOR, S6K e pS6K)	

## 4.2. Ética em pesquisa humana

O projeto foi aprovado pela Comissão de ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CAAE: 54931116.6.0000.5467); o Comitê de Ética Humana do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (CAAE: 54931116.6.3001.0076) e a Comissão de Ética da Santa Casa da Misericórdia de São Paulo (CAAE: 54931116.6.3002.5479) de acordo com a *Declaração de Helsinque* (2013). Todos os participantes assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido antes de entrar no estudo (TCLE- **ANEXO A**).

#### 4.3. Recrutamento dos pacientes e avaliação clínica

O recrutamento dos pacientes de forma voluntária foi realizado durante o período de abril de 2016 a fevereiro de 2020. Os pacientes elegíveis foram convidados por cirurgiões especialistas da Clínica Cirúrgica do Hospital Universitário (HU) e do Departamento de Coloproctologia da Irmandade Santa Casa de Misericórdia de São Paulo. Para confirmação da elegibilidade do paciente foram utilizados os seguintes critérios de inclusão: 1. Idade entre 18 a 100 anos; 2. Ambos sexos e sem discernimento de escolaridade, classe social ou da raça; 3. Índice de massa corporal (IMC) <29 kg/m<sup>2</sup>; 3. Diagnóstico de câncer gastrointestinal; 4. Sem tratamento anti-inflamatório ou anticancerígeno prévio; e 5. Ausência de doenças inflamatórias ou autoimunes, insuficiência hepática, insuficiência renal ou síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS).

Além disso, para os exames de ressonância magnética reduzimos a idade de inclusão entre 40 e 80 anos e adicionamos os seguintes critérios de exclusão: mulheres grávidas; cadeirantes; pacientes com diagnóstico de epilepsia; e pacientes que possuíam marca-passo cardíaco, implantes metálicos, aparelhos dentários, portadores de pinos odontológicos, sonda enteral ou qualquer objeto ferromagnético.

Após à obtenção do termo de consentimento livre e esclarecidos, todos os pacientes foram submetidos à análise das medidas antropométricas (idade, peso, altura) e foram entrevistados utilizando-se os seguintes questionários:

- QLQ-C30 [avaliação da qualidade de vida]: este questionário foi criado pela Organização Europeia para Pesquisa e Tratamento do Câncer (EORTC) e inclui 30 perguntas que avaliam três escalas: Funcional (aspectos físicos, cognitivos, emocionais e sociais), Sintomática (fadiga, dor, náuseas e vômitos) e Saúde global, onde porcentagens menores indicam pior qualidade de vida (AARONSON et al., 1993);
- FAACT-ESPEN [avaliação funcional da anorexia e caquexia]: Os escores FAACT-ESPEN foram criados pela Sociedade Europeia de Nutrição Clínica e Metabolismo (ESPEN) como uma ferramenta confiável para diagnosticar anorexia. Consiste em 12 questões relacionadas ao apetite e a ingestão

alimentar, onde valores mais baixos indicam a presença de anorexia (AREZZO DI TRIFILETTI et al., 2013);

 ECOG [avaliação do desempenho]: A escala ECOG foi desenvolvida pelo Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) e descreve o nível de funcionamento dos pacientes em uma faixa de 0 a 5 (totalmente ativos a mortos), avaliando seu desempenho físico diário (OKEN et al., 1982).

O protocolo clínico-cirúrgico do paciente não teve alterações em decorrência da participação no estudo, como descrito no TCLE.

4.4. Coleta de sangue

Aproximadamente 20mL de sangue dos pacientes em jejum foram coletados antes do procedimento cirúrgico por um profissional da saúde. O sangue foi colocado em tubos contendo ou não anticoagulante (EDTA) e depois centrifugado a 3000 rpm por 15 minutos a 4°C para obtenção de plasma e soro, respectivamente. Em seguida, o plasma e o soro foram transferidos e aliquotados em microtubos de plástico e armazenados em freezer a -80°C, para as posteriores análises.

4.5. Avaliação de parâmetros clínicos e Análises bioquímicas

Os parâmetros bioquímicos foram quantificados no analisador automático Labmax 240 (Labtest®, Tóquio, Japão), empregando kits comerciais para proteína C-reativa (PCR) e Albumina (respectivamente: Cat #331 e #19 *Diagnostic Labtest*, Lagoa Santa, MG, Brasil). O conteúdo de hemoglobina foi obtido de registros hospitalares antes da cirurgia.

4.6. Diagnóstico da caquexia

Para diagnóstico da caquexia foram utilizados os critérios estabelecidos por Evans *et. al* (2008) (EVANS et al., 2008) (Figura 1). O paciente caquético deve apresentar uma perda de peso corporal involuntária nos últimos 6 meses (maior ou igual a 5% da massa corporal habitual); IMC menor que 20 kg/m<sup>2</sup>; e pelo menos três dos cinco critérios seguintes: 1. diminuição da força muscular; 2. fadiga; 3. anorexia; 4. baixo índice de massa livre de gordura; e 5. alterações bioquímicas caracterizadas pelo aumento de marcadores inflamatórios (PCR >5mg/L; IL-6 >4 pg/mL), anemia (Hb <12 g/dL), ou hipoalbuminemia (<3.2g/dL).

Tendo em consideração os critérios descritos acima, para a classificação objetivas dos pacientes foi utilizada uma ferramenta de Excel® (Office 2021) desenvolvida pelo Dr. Rodolfo Gonzalez Camargo (**ANEXO B**).

### 4.7. Grupos experimentais

Após a classificação e de acordo com o quadro clínico, os pacientes voluntários foram divididos em dois grupos:

**Grupo Câncer sem Caquexia (WSC):** voluntários portadores de tumor gastrointestinal, submetidos a procedimento cirúrgico para retirada do tumor;

**Grupo Câncer com Caquexia (CC):** voluntários caquéticos portadores de tumor gastrointestinal, submetidos a procedimento cirúrgico para retirada do tumor.

## Estudo 1 - Análise dos efeitos sistêmicos e periféricos da caquexia: caracterização do conteúdo proteico no soro de pacientes com câncer

Nesse estudo, para caracterizar marcadores circulantes foram utilizadas amostras séricas dos pacientes e foram realizadas análises de determinação da expressão proteica por ensaio Luminex® e ensaio ELISA (do inglês, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), como descrito detalhadamente nos seguintes tópicos.

4.8. Determinação da expressão proteica por ensaio Luminex®

A técnica do ensaio de Luminex® consistiu da incubação por 2 horas (20-25°C, temperatura ambiente, *RT*) das amostras de soro com a mistura de microesferas Magplex® (Grand Island, NY, USA) cobertas com diferentes anticorpos alvo (listados na Tabela 1) dependendo dos diversos kits comerciais utilizados (*Millipore* kit: **HCVD2MAG-67K, HCYTMAG-60K-PX30; HMHEMAG-34K; e HNPMAG-35K**). Posteriormente, para a detecção dos antígenos-alvo ligados às microesferas foi necessária incubação por 1 hora (*RT*) com uma mistura de anticorpos de captura

biotinilados; e seguido da incubação com estreptavidina marcada com ficoeritrina por 30 minutos. Todas as incubações ocorreram sob agitação constante a 600 rpm e *RT*. As microesferas foram, então, identificadas por meio da ficoeritrina usando o equipamento Luminex® MAGPIX (Life Technologies). Seguindo as orientações do fabricante, foi realizada uma rotina de limpeza, calibração (MAGPIX® Calibration Kit MPX-CAL-K25) e verificação (MAGPIX® Performance Verification Kit MPX-PVER-K25); posteriormente, procedeu-se com a determinação e quantificação da expressão proteica com a utilização do software do equipamento (xPONENT® 4.2). Após a leitura do aparelho, os valores obtidos para os diferentes metabolitos foram analisados no software Analyst 5.1.

HCVD2MAG-67K (Painel para detecção de fatores associados a doença inflamatória) em humanos			
Alvos	Abreviação		
Protease de clivagem do fator de von Willebrand	ADAMTS13		
Dímero-D	Dímero-D		
Lipocalina Associada à Gelatinase Neutrofílica	NGAL		
Proteína amilóide A sérica	SAA		
Mioglobina	Mioglobina		
Mieloperoxidase	MPO		
P-selectina	P-selectina		
Molécula de adesão da célula vascular solúvel	sVCAM		
HCYTMAG-60K-PX30 (Painel para detecção de citocinas) em humanos			
Alvos	Abreviação		
Interleucina-1 beta	IL-1β		
Interleucina -6	IL-6		
Interleucina -8	IL-8		
Interleucina -10	IL-10		
Interferon gama	IFNγ		
Fator de necrose tumoral alfa	ΤΝFα		
Proteína quimioatraente de monócitos 1	MCP1/CCL2		
Proteína inflamatória dos macrófagos -1α	MIP-1α/CCL3		
Proteína inflamatória dos macrófagos -1β	MIP-1β/CCL4		
HMHEMAG-34K (Painel para detecção de hormônios) em humanos			
Alvos	Abreviação		

Tabela 1. Lista de fatores analisados por ensaio de Luminex®

Amilina	Amilina
C-peptídeo	C-peptídeo
Grelina	Grelina
Peptídeo inibidor gástrico	GIP
Glucagon	Glucagon
Peptídeo semelhante a Glucagon 1	GLP-1
Insulina	Insulina
Leptina	Leptina
Polipeptídeo pancreático	PP
Peptídeo YY	PYY
HNPMAG-35K (Painel para detecção de neuropeptídios) em humanos	
HNPMAG-35K (Painel para detecção de neuropeptídios) em humanos Alvos	Abreviação
HNPMAG-35K (Painel para detecção de neuropeptídios) em humanosAlvosβ-Endorfina	<b>Abreviação</b> β-Endorfina
HNPMAG-35K (Painel para detecção de neuropeptídios) em humanos       Alvos         β-Endorfina       Neurotensina	<b>Abreviação</b> β-Endorfina Neurotensina
HNPMAG-35K (Painel para detecção de neuropeptídios) em humanos         Alvos         β-Endorfina         Neurotensina         Oxitocina	Abreviação β-Endorfina Neurotensina Oxitocina
HNPMAG-35K (Painel para detecção de neuropeptídios) em humanos         Alvos         β-Endorfina         Neurotensina         Oxitocina         Orexina A	Abreviação β-Endorfina Neurotensina Oxitocina Orexina A
HNPMAG-35K (Painel para detecção de neuropeptídios) em humanos         Alvos         β-Endorfina         Neurotensina         Oxitocina         Orexina A         Substância P	Abreviação β-Endorfina Neurotensina Oxitocina Orexina A Substância P
HNPMAG-35K (Painel para detecção de neuropeptídios) em humanos         Alvos         β-Endorfina         Neurotensina         Oxitocina         Orexina A         Substância P         Hormônio estimulante de alfa-melanócitos	Abreviação β-Endorfina Neurotensina Oxitocina Orexina A Substância P α-MSH
HNPMAG-35K (Painel para detecção de neuropeptídios) em humanos         Alvos         β-Endorfina         Neurotensina         Oxitocina         Orexina A         Substância P         Hormônio estimulante de alfa-melanócitos         Hormônio concentrador de melanina	Abreviação β-Endorfina Neurotensina Oxitocina Orexina A Substância P α-MSH MCH

## 4.9. Determinação da expressão proteica por ensaio *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA)

Foram realizadas técnicas de ELISA sanduíche e ELISA por competição conforme descrito nos protocolos a seguir:

## 4.9.1 Técnica ELISA sanduíche

O protocolo para a realização da técnica ELISA sanduíche consistiu da incubação das amostras de soro com o anticorpo de captura específico anti-humano Neuropeptídio Y (NPY) IgG (Elisa *Millipore* Kit: **EZHNPY-25K**), por 2 horas (*RT*), numa placa com anticorpos ancorados previamente; para a detecção do antígeno-alvo imobilizado e ligado aos anticorpos específicos foi necessária incubação por 1 hora (*RT*) com anticorpos de detecção biotinilados.

#### 4.9.2 Técnica ELISA por competição

O protocolo para a realização da técnica ELISA por competição consistiu no uso de uma placa pré-revestida com anticorpo secundário e os locais de ligação não específicos bloqueados. Seguiu-se a incubação das amostras de soro com o anticorpo primário específico para anti-humano hormônio concentrador de melanina (MCH) (*Phoenix Pharmaceuticals* Kit: **EK-070-47**) e o peptídeo biotinilado, por 2 horas (*RT*). Dessa forma, o anticorpo secundário se liga ao fragmento Fc do anticorpo primário específico cujo fragmento Fab sofre competição pelo peptídeo biotinilado e o peptídeo de interesse na amostra.

Ambos os protocolos requerem posterior incubação com estreptavidina marcada com a enzima peroxidase de raiz forte por 30 minutos e a adição do substrato 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina. Todas as incubações ocorreram sob agitação constante a 600 rpm e *RT*. Finalmente, a enzima reage com o substrato adicionado, gerando cor. A atividade enzimática é medida espectrofotometricamente pela absorbância a 450nm, corrigida a partir da absorbância a 590nm, usando o espectrofotômetro Synergy H1 Multi-Mode Reader (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA). Por um lado, na Técnica ELISA sanduíche a intensidade da reação é proporcional à quantidade de antígeno presente. Por outro lado, na Técnica ELISA por competição a intensidade de cor é diretamente proporcional à quantidade de peptídeo biotinilado, mas inversamente proporcional à quantidade de peptídeo de interesse na amostra. Após a leitura do aparelho, as absorbâncias foram interpoladas a uma curva padrão, polinomial de 4-parametros, de concentrações conhecidas de NPY ou MCH humano no software GraphPad Prism versão 8.0. (GraphPad Software, Inc).

## Estudo 2 – Expressão gênica hipotalâmica de neuropeptídios e receptores de hormônios em modelo animal

O hipotálamo desempenha um papel proeminente na composição corporal e no balanço energético sendo altamente sensível aos mediadores metabólicos periféricos observados no Estudo 1. Por esse motivo, a proposta foi investigar a resposta hipotalâmica aos metabólitos circulantes em animais portadores de tumor que desenvolvem caquexia. 4.10. Ética em pesquisa em modelo animal

Este estudo possui a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo) (CEUA-ICB/USP) protocolada sob o CEUA nº 8003081117. Todas a manipulação dos animais foi realizada de acordo com os princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

## 4.11. Animais

Ratos Wistar machos adultos com dez semanas de idade (290–335 g) foram obtidos do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos em condições de temperatura controlada (23 ± 1°C) com ciclo claro-escuro constante (luz acesa das 8h às 20h), recebendo água e ração *ad libitum* (ração comercial; Nuvilab, Nuvital, Brasil). A ingestão de alimentos e água foi mensurada diariamente.

### 4.12. Desenho Experimental e inoculação do tumor

Os animais foram subdivididos aleatoriamente em dois grupos: Controle (n = 5) e AH-130 (n = 5). O grupo com tumor (AH-130) recebeu um inóculo intraperitoneal (i.p.) de 10<sup>8</sup> células de hepatoma ascítico Yoshida AH-130, um modelo bem validado que permite o desenvolvimento de caquexia severa (TOLEDO et al., 2011). Por questões éticas (grande volume do tumor), a duração do experimento foi de sete dias. No dia 7 após a inoculação do tumor, os animais foram pesados e anestesiados com injeção i.p. de ketamina/xilazina (3:1) (Imalgene® e Rompun®, respectivamente). O tumor foi retirado da cavidade peritoneal e seu volume avaliado. Os hipotálamos foram rapidamente extraídos e armazenados a -80°C, para posterior processamento.

4.13. Análise de expressão gênica

#### Extração de RNA

O hipotálamo total foi homogeneizado utilizando reagente Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA), seguindo recomendações do fabricante para extrair o RNA total. As

concentrações de RNA foram determinadas medindo-se a absorbância de 260nm/280nm em espectrofotômetro Synergy H1 Multi-Mode Reader (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA).

## Síntese de cDNAs

Para obter cDNA foi utilizado 2µg de RNA total no termociclador (Veriti®, ThermoFisher, USA) junto com o kit comercial *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Invitrogen no. 4375575) que contém random primers, desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTP, 10 mM) e 500U/µL de transcriptase reversa (MultiScribe<sup>™</sup>).

### Reação em cadeia polimerase em tempo real (RT-PCR)

Para avaliar a expressão gênica foi empregada a técnica de RT-PCR utilizando Sybr Green master mix (Power SYBR® Green PCR Master Mix, Applied Biosystems), o instrumento QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR System (Applied Biosystems) e primers específicos para cada gene (Invitrogen, Life Technologies), listado na Tabela 2. A expressão relativa do mRNA foi padronizada para o gene constitutivo HPRT e calculada usando o método  $\Delta\Delta$ CT. Não foram observadas diferenças na expressão de HPRT entre os grupos.

Gene	Sense	Antisense
NPY	TGTGTTTGGGCATTCTGG	GCTGGATCTCTTGCCATATC
NPY R	GGCCCACTCTGTTTCATATTC	GTCTGACTGGACCTGTACTT
POMC	ATAGACGTGTGGAGCTGGTGC	GCAAGCCAGCAGGTTGCT
CART	CGCTGTGTTGCAGATTGAAGC	AGCGTCACACATGGGGACTT
GLP-1R	ACAGGTCTCTTCTGCAACCG	ATGCCCTTGGAGCACACTAC
Ob Rb	CCAGTACCCAGAGCCAAAGT	GGGCTTCACAACAAGGATGG

NPY: Neuropeptídio Y; NPY R: Receptor de Neuropeptídio Y; POMC: Pro-opiomelanocortina; CART: transcrito regulado por cocaína e anfetamina; GLP-1R: Receptor de GLP-1 Receptor; Ob Rb: Receptor de leptina.

## Estudo 3 - Avaliação por neuroimagem *in vivo* da morfologia, conectividade e funcionalidade do sistema nervoso central de pacientes com câncer

Nessa etapa, com o intuito de elucidar possíveis alterações no sistema nervoso central associadas à síndrome da caquexia, realizamos o primeiro estudo de neuroimagem em humanos utilizando as técnicas descritas abaixo.

4.14. Aquisição de imagens por ressonância magnética (RMI)

As imagens cerebrais por RMI dos participantes foram adquiridas pelo equipamento de ressonância magnética Philips® Achieva de 3Tesla, utilizando bobina de crânio de 32 canais, localizado no Instituto de Radiologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (InRad-FMUSP). O protocolo de aquisição das imagens incluiu várias técnicas:

1) Morfometria baseada no voxel **(VBM):** emprega uma sequência de imagens ponderadas em T1 e os seguintes parâmetros: tempo de repetição (TR) = 7ms, tempo de eco (TE) = 3.2ms, ângulo de inclinação (do inglês, *flip angle*) = 8, campo de visão (do inglês, field of view/FOV) = 240mm × 240mm × 180mm, espessura do corte = 1mm, sem intervalos, número de excitações (NEX) = 1, matriz da aquisição= 240 × 240 pixels. Resultando em voxels com tamanho isotrópico de 1x1x1mm com 180 cortes contínuos e sequenciais cobrindo o cérebro total. O tempo estimado para aquisição das sequências foi de aproximadamente 30 minutos;

2) Imagem por tensores de difusão (DTI): emprega um sequencia de imagens ponderadas em T2 sem gradiente de difusão (b=0 s/mm<sup>2</sup>) e imagens por gradiente de difusão (b= 1000S/mm<sup>2</sup>) obtidas em 68 direções não colineares. Assim como, utilizando os seguintes parâmetros: FOV = 256x256x144mm, espessura do corte = 2mm, sem intervalos, matriz da aquisição= 128 × 128 pixels, resultando em voxels com tamanho isotrópico de 2x2x2mm, com 50 secções cobrindo o cérebro total. O tempo estimado para aquisição das sequências foi de aproximadamente 20 minutos;

3) Espectroscopia por ressonância magnética focalizada na região do hipotálamo (MRS): cuja aquisição foi realizada com a técnica PRESS (do inglês, *Point Resolved single voxel*) com TE = 35ms, TR = 2000ms e 160 repetições. Foram

adquiridas também para efeitos de referência e correção de erros de correntes espúrias 16 espectros sem supressão de água. O tamanho do voxel foi de 8cm<sup>3</sup> (2x2x2 cm<sup>3</sup>), localizado na altura do hipotálamo. Para reduzir o efeito do desvio químico foram colocadas quatro barras de saturação colocadas dentro dos limites da sobreposição do voxel de água e do N-acetilaspartato (NAA). O O tempo estimado para aquisição das sequências foi de aproximadamente 8 minutos;

4) Ressonância magnética funcional em repouso (resting state fRMI, rs-fMRI): essa técnica emprega uma sequência de imagem ecoplanares ponderada em T2 e os seguintes parâmetros: TR= 2000ms, TE=30ms, ângulo de inclinação= 80, FOV = 240x240mm, com intervalo entre os cortes de 0.5mm, matriz de aquisição = 80x80 pixels. Resultando em 32 fatias, com secções de espessura de 4mm. Para a realização da fRMI os pacientes foram informados para manter os olhos abertos e olhar para um ponto fixo. O tempo estimado de aquisição das sequências foi de aproximadamente 10 minutos.

Durante todo o exame para aquisição de todas as imagens utilizou-se uma almofada de espuma e um suporte de cabeça para limitar os movimentos da cabeça. Foi oferecido ao paciente um protetor de ouvido, para melhorar o conforto acústico.

Finalmente, todas as imagens obtidas de cada paciente foram sujeitas a um processo de verificação realizado pela neuroradiologista Profa. Dra. Maria da Graça Martin. A finalidade desde etapa foi checar a qualidade das imagens e identificar possíveis artefatos que comprometeriam o posterior processamento e análise, assim como avaliar possíveis lesões cerebrais pré-existentes sem relação ao presente estudo.

## 4.14.1 Processamento das imagens pela morfometria baseada no voxel (VBM)

A VBM, mais especificamente a VBM otimizada-DARTEL (do inglês, Diffeormorphic Anatomical Registration Through Exponentiated Lie Algebra) (ASHBURNER; FRISTON, 2005), foi utilizada para avalia o volume regional cerebral gerando informação sobre anormalidades regionais de substância cinzenta e branca no cérebro todo. O processamento das imagens obtidas, em parceria com Dr. Geraldo Busatto Filho (FMUSP) e Dr. Ricardo Riyoiti Uchida (ISCMSP), foi realizado através do pacote *Statistical Parametric Mapping, version 12* (SPM12) (Wellcome Trust Centre for Neuroimaging, UCL, London, UK; disponível em www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm), executada no interpretador de comandos MATLAB 9.2, 2017a (Mathworks, Sherborn, MA, USA) e se realiza em de 4 etapas (sumarizadas na Figura 5):

- Remoção na imagem do crânio e meninges (do inglês, *Skull strip*), reorientação das imagens anatômicas seguindo a convenção neurológica e marcação da comissura anterior considerada como ponto de origem [x y z (0, 0, 0)/ Instituto Neurológico de Montreal 152 (MNI 152)];
- Segmentação das imagens em substância cinzenta (SC), substância branca (SB) e líquido cefalorraquidiano (LCR);
- Normalização das imagens através do uso de moldes padrões construídos por meio de imagens do próprio estudo. Este procedimento permite obter um modelo customizado que deriva das próprias imagens estruturais ponderas em T1 dos pacientes;
- Suavização utilizando-se um filtro isotrópico gaussiano de 8mm full-width at half-maximum (FWHM), que permite lidar com possíveis imperfeições da segmentação e minimizar as variações anatômicas corticais nos cérebros dos pacientes.



**Figura 5.** Protocolo de processamento pela VBM otimizada-DARTEL (Fonte: Elaborada pela autora)

4.14.2 Processamento das imagens por tensores de difusão (DTI)

A da técnica de DTI possibilita visualizar a localização, orientação, e anisotropia da matéria branca do cérebro e os feixes cerebrais. Inicialmente as imagens se transformam do formato DICOM ao NiFTI. Das sequências adquiridas

para esta técnica foram extraídas as direções de gradiente (bvec) e seus respectivos b-valores (bvals) necessários para obter os valores quantitativos da DTI. O processamento das imagens foi realizado através do programa FSL [Linux – TBSS (do inglês, *Tract Based Spatial Statistics*)], nas etapas a seguir (sumarizadas na Figura 6). Conduzimos o processo de correção dos volumes, o *skull strip* e a segmentação automatizada (criando um molde do cérebro do inglês, *Brain mask* para garantir que calculemos apenas tensores dentro do cérebro, e não no ar ao redor). Também, calculou-se os valores dos tensores de difusão [anisotropia fraccionada (FA), difusividade axial (L1) difusividades radiais (L2 e L3), difusividade média (MD), modo de anisotropia (MO)] e autovetores (V1, V2, V3). Sendo a FA utilizada para as análises enquanto através do método TBSS, se realizam os processamentos dos tratos das fibras sujeito a sujeito. Posteriormente, as análises estatísticas foram realizadas com o software SPM12 e MATLAB 9.2.



**Figura 6.** Protocolo de processamento para DTI (Fonte: Elaborada pela autora)

## 4.14.3 Processamento das imagens de espectroscopia (MRS) focalizadas no hipotálamo

A avaliação da sequência de espectroscopia de ressonância magnética (MRS), focalizada na região do hipotálamo e tamanho do voxel de 8 cm<sup>3</sup> (2x2x2cm<sup>3</sup>), foi realizada utilizando o *software* LCModel (versão 6.3) (PROVENCHER, 2001)para quantificação dos níveis de glutamato (Glu), soma de glutamato e glutamina (Glx), N-acetilaspartato (NAA), mioinositol (mI), soma de glicerofosfocolina (GPC) e fosfocolina (PCh) e creatina (Cr) (Figura 7) (PROVENCHER, 2001). Um sinal de água

não suprimido foi usado como uma referência interna. Para garantir a precisão das medições obtidas, apenas os resultados de metabólitos com valores de limite inferior de Cramer-Rao (CRLB) de menos de 20% foram considerados (KREIS, 2004). Da mesma forma, espectros de baixa resolução espectral [largura na meia altura do máximo de intensidade (FWHM)> 0,1ppm] e uma relação sinal-ruído abaixo de 5 foram excluídos da análise. As concentrações de metabólitos são expressas como razões sobre Cr, uma vez que os valores absolutos são geralmente considerados menos confiáveis, pois são mais suscetíveis aos efeitos do volume parcial do que as razões sobre Cr.



Figura 7. Espectro típico obtido pela MRS na região do hipotálamo em um paciente

Em preto o sinal original e em vermelho o ajuste ao espectro calculado pelo software LCModel. A linha superior mostra o ruído residual após subtrair o ajuste (Fonte: Elaborada pela autora).

## 4.14.4 Processamento das imagens de Ressonância magnética funcional em repouso (*resting state* fRM, rs-fMRI)

Para avaliação da atividade cerebral basal através de medida do efeito BOLD (*blood oxygenation level-dependent*) foi utilizado o software CONN toolbox 19.c. e SPM12. O pré-processamento das imagens foi realizado nas seguintes etapas (sumarizadas na Figura 8):

- Descarte das primeiras imagens de rs-fMRI o que permitiu estabilizar o sinal e padronizar as imagens dos pacientes;
- Correção temporal entre os cortes para corrigir as diferenças de tempo na aquisição que foi realizada na ordem ascendente;
- Realinhamento que consiste no redirecionamento de todas as imagens em relação a um corte padrão, eliminando assim possíveis artefatos de movimento;
- Detecção de *outliers*, sendo adotado uma análise conservadora no qual aquisições com deslocamento de estrutura acima de 0,5 mm ou alterações de sinal BOLD global acima de 3 S.D (desvio padrão do inglês, *standard deviation*) foram sinalizados como valores discrepantes potenciais na avaliação da amostra do estudo;
- Corregistro para obtenção estimada de uma imagem transformada ideal entre a imagem rs-fMRI de referência (sinal BOLD médio) e a imagem estrutural de referência (T1).
- Segmentação, normalização e suavização seguindo os mesmos princípios que na técnica de VBM (veja acima 4.14.1.), tendo-se realizado os mesmos passos nos dados funcionais com os seguintes parâmetros: nos três segmentos padrões (substância branca, cinzenta e líquido cefalorraquidiano), MNI como espaço padrão, e convolução espacial de 8 mm gaussianos de largura à meia altura, respectivamente.



**Figura 8.** Ilustração esquemática do pré-processamento padrão em CONN (Fonte: NIETO-CASTANON, 2020)

Após o pré-processamento, as imagens funcionais foram filtradas, objetivandose a eliminação ou minimização dos ruídos residuais no sinal BOLD decorrentes de efeitos fisiológicos, discrepantes e residuais de movimento do sujeito, sendo utilizados 12 parâmetros de correção de movimento, 5 parâmetros de ruído de substância branca e LCR, 32 parâmetros de *scrubbing* (valores discrepantes do sinal BOLD), 2 parâmetros para o efeito do estado de repouso (sem tarefa) e filtro temporal passa banda (de 0,008 Hz até infinito).

Finalmente, 31 regiões de interesse (ROIs) foram selecionadas a priori, com base em áreas nas quais a caquexia poderia estar causando alterações e considerando os resultados preliminares obtidos pela técnica de VBM. Em seguida, por meio de análise ROI-to-ROI, foram avaliadas as mudanças na força de conectividade (FC) e os resultados significativos foram corrigidos para comparação múltipla usando a taxa de descoberta falsa (FDR) e o nível de significância de 0,05.

## Estudo 4: Análise neuropatológica de tecido cerebral post-mortem de pacientes com caquexia

Todas as etapas de este estudo foram realizadas na Universidade de Oxford sob orientações do Professor Dr. Gabriele DeLuca, e formam parte do meu estágio no exterior (BEPE) de 1 ano de duração. Nesse estudo, a proposta foi validar as alterações obtidas nas análises de RMI (**Estudo 3**) em tecido *post-mortem* humano, avaliando a morfologia neuronal, o perfil da neuróglia e fatores inflamatórios no cérebro humano caquético.

4.15. Coleta de cérebro humano post-mortem

O tecido humano *post-mortem* foi obtido do *Oxford Brain Bank* e coletado de acordo com o *UK Human Tissue Act*, após a obtenção do termo de consentimento livre e esclarecidos para todas as doações (*Oxford Brain Bank Research Ethics Committee* no 15/SC/0639, TW536). Os pacientes elegíveis foram adultos, de 40 a 80 anos, com diagnóstico de câncer gastrointestinal, pâncreas e fígado, entre outros. Para este estudo, foi criada uma coorte de autópsia humana de pacientes com câncer posteriormente dividida em duas coortes: câncer sem caquexia (WSC, n = 6) e câncer com caquexia (CC, n = 10), seguindo os critérios propostos por Evans *et al.* (EVANS et al., 2008, descritos acima 2.1) utilizando registros médicos e dados clínico. Além disso, controles não neurológicos pareados por idade e sexo (CONTROLE, n = 10) foram disponibilizados para o estudo. A evidência de comprometimento cognitivo foi avaliada usando as escalas CERAD (do inglês, *AD Related pathology*) e Braak [estadiamento que consiste em avaliar emaranhados neurofibrilares (NFT)].

4.16. Preparação de tecido e obtenção de amostras (do inglês, sampling)

Cérebros *post-mortem* inteiros foram fixados por imersão em solução de formalina a 10% por ≥4 semanas e ≤4 meses. Casos com tempos de fixação mais longos foram omitidos para garantir a preservação da antigenicidade para imunohistoquímica (IHQ) (GILL; ISHAK; RYLETT, 2005).

O sampling do material fixado em formalina foi realizado em cada área de interesse (caudado, putâmen, amígdala, hipotálamo, tálamo e hipocampo), obtendo áreas transversais de substância cinzenta e branca (veja Figura 9). Nos blocos obtidos foram realizados cortes em séries de 6µm de espessura (micrótomo Leica RM2135), os quais foram montados em lâminas de vidro (*Superfrost plus slides* 

25x75x1mm, Thermo scientific) para as análises neuropatológicas quantitativas e semiquantitativas descritas detalhadamente nos tópicos a seguir.





a. gânglios da base (caudado e putâmen); b. amígdala; c. hipocampo; d. tálamo; e. hipotálamo.

## 4.17. Histologia básica na neuropatologia

Para analisar a densidade neuronal, realizar contagem de neurônios e estudar a morfologia dos neurônios, os cortes foram corados com hematoxilina e eosina (H&E, *Thermo Shandon Linistain*<sup>TM</sup> *Random Access Stainer*). As lâminas foram desparafinizadas e reidratadas usando as etapas padrão de reidratação [3x5 min em Xileno, 2x100% Etanol, 70% Etanol, água (H<sub>2</sub>0)]. Seguido foi realizada a coloração de H&E em 6 etapas: 1) 3x Haematoxilina de Harris (Thermo Scientific<sup>TM</sup> 6765003) e H<sub>2</sub>0; 2) 0,4% de álcool ácido e H<sub>2</sub>O; 3) Água da torneira Scotts (Thermo Scientific<sup>TM</sup> 6769001) e H<sub>2</sub>0; 4) 2x 0,25% de Eosina aquosa (Thermo Scientific<sup>TM</sup> 6766009) + 0,025% de ácido acético e H<sub>2</sub>O; 5) Secagem e desidratação dos cortes (H<sub>2</sub>O, 70% Etanol, 2x100% Etanol, 3x Xileno); e 6) Montagem das lâminas usando DPX (Fisher Scientific, 12658646).

## 4.18. Imunohistoquímica (IHQ)

A coloração foi realizada em cortes de 6µm de espessura. Para remoção da parafina, as lâminas foram aquecidas a 60°C por 20 minutos em forno e posteriormente reidratadas usando uma curva padrão de reidratação (3x5 min em Xileno, 2x100% Etanol, 70% Etanol, H<sub>2</sub>0). Para o bloqueio da atividade da peroxidase endógena as lâminas foram expostas em água oxigenada a 3% (peróxido de

hidrogénio, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) por 30 minutos. A recuperação de antígeno mediada por calor foi conduzida em tampão citrato ou solução salina tamponada com Tris (pH=6, Tris EDTA) usando micro-ondas (por 10min) ou autoclave (15psi, 121°C por 60min) dependendo do anticorpo usado. Após o resfriamento das lâminas, os cortes de tecido foram colocados em unidades Shandon Sequenza e lavadas com em Tampão fosfatosalino [do inglês, Phosphate-buffered saline (PBS)] ou tampão tris-salino tween [do inglês, Tris Buffered Saline with Tween 20, (TBS-T)]. Os anticorpos primários, preparados em diluente de anticorpo (S2022 Dako REAL Antibody Diluent), foram aplicados durante 1h à temperatura ambiente. Os cortes foram lavados 2x em PBS ou TBS-T. Em seguida, o anticorpo secundário (Dako REAL EnVision Detection System, Peroxidase/DAB, Coelho/Camundongo, HRP) foi aplicado de acordo com as instruções do fabricante por 40 minutos. Os cortes foram lavados novamente em PBS ou TBS-T (2x5min) e expostas ao kit 3,3-diaminobenzidina (DAB) EnVision+ (Dako, Glostrup, Dinamarca) por 5 min. Após, os cortes foram lavados 2x5min com PBS ou TBS-T e contracorados com Hematoxilina de Harris (Leica, 3801560E) por 60s. Posteriormente, os cortes foram lavados em água, desidratados (H<sub>2</sub>O, 70% Etanol, 2x100% Etanol, 3x Xileno) e montados em lâminas com DPX (Fisher Scientific, 12658646).

Os métodos específicos para a recuperação de antígenos, as concentrações de anticorpos primários e os tempos de incubação foram ajustados e padronizados conforme mostrado na Tabela 3. Além disso, foram empregados controles positivos indicados pelo fabricante para otimização de anticorpos. Como controle negativo utilizou-se apenas anticorpo secundário no corte.

Esta técnica de IHC foi empregada em todos os cortes de caudado, putâmen, amígdala, hipocampo, tálamo e hipotálamo de todos os pacientes. Foram utilizados marcadores específicos para células da neuróglia como a molécula adaptadora ligante de cálcio ionizado-1 (Iba1), Cluster de Diferenciação 68 (CD68) e a proteína glial fribrilar ácida (GFAP) (micróglia, macrófagos e astrócitos, respetivamente). Assim como, foram avaliadas proteínas relacionadas a via mTOR [Hamartina (TSC1), Tuberina (TSC2), mTOR, mTOR fosforilada (pmTOR), proteína ribossomal S6 quinase (S6K) e s6K fosforilada (pS6K).

Alvo	Anticorpo primário	[]	Clone	Recuperação de Antígeno	Incubação	Controle positivo
lba1	Wako 019-19741	1:1000 in PBS	Policlonal	Autoclave Citrato	RT 1h	
GFAP	Dako z0334	1:2500	Policlonal	Micro-ondas Citrato	RT 1h	
CD68	Dako M0876	1:50	Clone PG-M1	Autoclave Citrato	RT 1h	Fígado
TSC1	Abcam ab40872	1:400	Clone EP318Y	Autoclave Tris EDTA	RT 1h	Cerebelo
TSC2	Abcam ab32554	1:400	Clone Y320	Autoclave Citrato	RT 1h	Cerebelo
mTOR	Cell signaling 2983	1:250	Clone 7C10	Autoclave Citrato	RT 1h	Fígado
pmTOR	Cell signaling 2976	1:100	Clone 49F9	Autoclave Citrato	RT 1h	Câncer de mama
S6K	Cell signaling 2708	1:100	Clone 49D7	Autoclave Tris EDTA	RT 1h	Câncer de mama
pS6K	Invitrogen PA5-38307	1:200	Policlonal	Autoclave Citrato	RT 1h	Câncer de mama

Tabela 3. Lista de padronização dos anticorpos

[]: Concentração; RT: temperatura ambiente

## 4.19. Aquisição de imagens

As lâminas coradas com H&E foram capturadas digitalmente usando um microscópio Olympus BX43 (Olympus Corporation) e um Aixocam MRc Zeiss Cam (Carl Zeiss Light Microscopy) com uma ampliação de 400x.

Para as marcações por IHC foi realizado um escâner digital completo dos cortes usando o escâner de cortes Aperio Scanscope® AT (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha; obtendo imagens visíveis com ampliação x1 - x400). Finalmente, foram criados algoritmos específicos para a contagem de células e de pixels para cada marcador (Tabela 4). Para ajustar os algoritmos adequadamente foi empregada uma imagem com coloração DAB para cada marcador que permitia limitar os algoritmos e garantia que todos os pixels com coloração positiva foram identificados e contados. Um corte de tecido controle, corado apenas com hematoxilina, foi usado para confirmar a especificidade do algoritmo.

Alvo	Fator de processamento de sinal	Sigma Gaussiano (μm)	Limiar da hematoxilina (OD)	Limiar do DAB (OD)
lba1	1.0	2	0,12	0,18
GFAP	1.0	2	0,15	0,2
CD68	1.0	2	0,17	0,16

Tabela 4. Algoritmos Qupath para quantificação

OD: densidade óptica.

Em seguida quantificou-se, de forma automatizada, a densidade de pixels imunopositivos (por  $\mu$ m<sup>2</sup>) em cada região de interesse do cérebro usando o programa Qupath v.0.1.2 (Figura 10), um *software* para análise de imagens digitais em patologia (BANKHEAD et al., 2017).





4.20. Análise das regiões de interesse

Após a coloração, todas as regiões analisadas (caudado, putâmen, amígdala, hipocampo, tálamo e hipotálamo) foram submetidas ao controle de qualidade (integridade do tecido e artefatos) e foram omitidos da análise os casos que apresentaram qualquer uma dessas características. Em seguida, a quantificação das lâminas foi feita às cegas (sem informação do grupo experimental ao que pertencem) e foram quantificadas (um mínimo de 3 amostras por grupo analisado).

#### 4.20.1 Análise quantitativa

As contagens neuronais foram realizadas em cortes de tecido corados com H&E, considerando como regiões de contagem as imagens adquiridas com ampliação x400. As células neuronais contendo um núcleo e um único e grande nucléolo foram contadas. Além disso, a densidade neuronal foi calculada dividindo-se o número de células pela área da região de contagem.

Para a quantificação automatizada dos marcadores específicos de células da neuróglia (Iba1- micróglia, CD68- macrófagos e GFAP- astrócitos), foram empregados os algoritmos descritos acima (refira-se ao item 4.19, Tabela 4). Utilizando o software Qupath foi possível mesurar o número de pixels corados positiva e negativamente para gerar um valor de positividade (positividade = número total de pixels positivos ÷ área total). Esta quantificação for realizada exclusivamente na matéria cinzenta de cada região do cérebro de interesse.

## 4.20.2 Análise semi-quantitativa

A medida global da atividade de mTOR foi avaliada usando análises de expressão semi-quantitativas para cada marcador relacionado à via de mTOR (TSC1, TSC2, mTOR, pmTOR, S6K e pS6K) de acordo com métodos publicados anteriormente (JENKINS et al., 2018). Foi criada uma escala de pontuação em cada região de interesse para avaliar a marcação de cada alvo, sendo: ausente (0), leve (1), moderado (2) ou abundante (3) (escalas apresentadas em **APÊNDICE A**).

4.21. Análise estatística

#### Dados adquiridos no Estudo 1 e 2:

As análises estatísticas foram realizadas usando Graphpad Prism 8.0. Os dados foram expressos como média ± EPM ou mediana [primeiro quartil; terceiro quartil]. Análises preliminares foram realizadas para garantir que as premissas de normalidade ou homocedasticidade não fossem violadas (teste de D'Agostino-Pearson, teste Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov). O teste Qui-quadrado foi usado para valores dicotômicos. Os testes T não pareado ou de Mann-Whitney com comparações múltiplas foram empregados para dados paramétricos e não

paramétricos, respectivamente. A significância foi considerada com valor de p <0,05. Correlações de Spearman foram realizadas entre medidas antropométricas, bioquímicas, níveis de citocinas, hormônios e neuropeptídios em pacientes com CC e WSC. O cálculo das correlações foi realizado excluindo os pacientes sem dados para uma variável específica usando funções standards GNU R. O código R usado para calcular as correlações e gerar os gráficos está disponível *online* em https://github.com/amphybio/collab/fernandez2021. Os valores de p que indicam a significância estatística dos dados foram indicados em vermelho ou preto na parte inferior de cada gráfico de dispersão quando p <0,05 ou p  $\geq$ 0,05.

#### Dados adquiridos no Estudo 3:

As análises estatísticas foram realizadas com modelos estatísticos disponíveis no SPM12. As mensurações "voxel a voxel" das imagens foi realizada por meio de teste T para observar as diferenças entre os volumes totais de SC e SB (aumento ou diminuição) considerando o cérebro inteiro, assim como as ROIs específicas. A significância foi considerada a partir de p <0,05. Os resultados considerados significativos foram aqueles que resistiram ao *family-wise error* (FWE) na correção por comparações múltiplas e apresentaram valores  $\leq$ 0,05 (pFWE $\leq$ 0,05). Para *resting state* fRM os resultados significativos foram corrigidos para comparação múltipla usando a taxa de descoberta falsa (FDR) e o nível de significância de 0,05.

### Dados adquiridos no Estudo 4:

Os dados foram expressos como média ± EPM ou mediana [primeiro quartil; terceiro quartil]. Análises preliminares foram realizadas para garantir que as premissas de normalidade ou homocedasticidade não fossem violadas (teste de D'Agostino-Pearson, teste Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov). Os testes <u>One-way</u> ANOVA ou Kruskal-Wallis com múltiplas comparações foram empregados para dados humanos paramétricos e não paramétricos, respectivamente. As comparações não pareadas post hoc (teste de Tukey para dados paramétricos ou Teste de Dunn para valores não paramétricos) foram realizadas quando apropriado. O teste Qui-quadrado foi usado para valores dicotômicos. As análises foram realizadas usando GraphPad Prism 8.0. e todos os testes de hipóteses foram realizados considerando-se o nível de significância de 0,05.

# Resultados

#### 5. **RESULTADOS**

## Estudo 1 - Análise dos efeitos sistêmicos e periféricos da caquexia: caracterização do conteúdo proteico no soro de pacientes com câncer

#### 5.1. Dados clínicos

Setenta pacientes com câncer colorretal participaram do estudo. Os pacientes foram divididos em dois grupos: pacientes com câncer sem caquexia (WSC n=31); e pacientes com câncer e caquexia (CC n=39). As características gerais dos pacientes (dados clínicos e bioquímicos) encontram-se listadas na Tabela 5. Não houve diferenças nas distribuições de gênero, idade, altura ou estágio tumoral entre os grupos (p >0,05). A massa corporal prévia (MC), entendendo-se como aquela relatada pelo paciente no tempo de 6 meses antes do início do estudo, não mostrou diferença entre os grupos (p = 0,240). No entanto, o grupo CC apresentou valores significativamente inferiores (p = 0,014) em relação ao peso corporal atual (MC atual), quando comparado com o grupo WSC. Além disso, o grupo CC mostrou perda de peso acentuada (-14,71%, p <0,0001) e menor índice de massa corporal (kg/m<sup>2</sup>, p = 0,0007) em relação a o grupo WSC, em linha com Evans *et. al.* 2008 (perda de peso> 5% nos últimos 6 meses, de forma involuntária).

Em relação à análise dos parâmetros bioquímicos realizada no soro dos pacientes, observa-se que a concentração de hemoglobina foi significativamente inferior no grupo CC (p = 0,0003), indicando a presença de anemia. Além disso, o grupo CC apresentou maior conteúdo sérico de proteína C reativa (PCR, p = 0,0008) e menor de albumina (p = 0,029), caracterizando a presença de inflamação sistémica e desnutrição nos indivíduos caquéticos, respetivamente.

Em adição, a hemoglobina (r = 0,367; p = 0,03) e a albumina (r = 0,474; p = 0,002) tiveram correlação positiva com o IMC, bem como correlações negativas com a perda de peso (r = -0,356, p = 0,036; r = -0,414, p = 0,009, respetivamente) no grupo CC. Foi observada correlação negativa entre PCR e albumina no paciente caquético (r = -0,487, p = 0,002), indicando que a inflamação sistêmica está associada ao comprometimento do estado nutricional. Não foram encontradas correlações entre os

parâmetros antropométricos e bioquímicos em pacientes com WSC (referir-se ao painel de correlações no **APÊNDICE B**).

As avaliações dos questionários revelaram que o grupo CC apresentou escores mais baixos no FAACT-ESPEN (significando anorexia, p = 0,0002) e escores mais elevados no ECOG (p <0,0001), o que demonstra menor desempenho no CC em comparação com WSC. No houve diferenças em relação a qualidade de vida mensurada com o QLQ-C30.

Características	WSC	сс	p-valor
Ν	31	39	
Sexo (M/F) (n)	18/13	22/17	0,889
Altura(m)	1,64 ± 0,02	1,65 ± 0,01	0,912
Idade (anos)	61,55 ± 2,21	63,21 ± 2,09	0,591
MC previa (kg)	68,76 ± 2,01	72,37 ± 2,20	0,240
MC atual (kg)	68,47 ± 2,00	61,28 ± 1,99	0,014
Δ MC (%)	0,00 [0,0; 0,0]	-14,71 [-16,81; -8,96]	<0,0001
IMC (kg/m²)	25,23 ± 0,47	22,47 ± 0,58	0,0007
Estágio tumoral inicial (I-II)	18 (64,29%)	18 (48,65%)	0,209
Estágio tumoral avançado (III-IV)	10 (35,71%)	19 (51,35%)	
Hemoglobina (g/dL)	13,39 ± 0,39	11,37 ± 0,35	0,0003
PCR (mg/L)	5,85 ± 0,83	9,67 ± 0,71	0,0008
Albumina (g/dL)	3,76 ± 0,15	3,27 ± 0,16	0,029

 Tabela 5. Características gerais dos pacientes

Qualidade de vida (QLQ-C30)	73,28 ± 3,63	67,95 ± 3,64	0,307
Anorexia (FAACT- ESPEN)	36,9 ± 0,63	31,62 ± 1,10	0,0002
Escala funcional (ECOG)	0,54 ± 0,11	1,21 ± 0,10	<0,0001

Dados expressos em média ± EPM ou como mediana [1º; 3º quartil]. N: tamanho da amostra; WSC: Câncer sem caquexia; CC: Câncer com caquexia; MC: massa corporal; IMC: índice de massa corporal; PCR: proteína C reativa. As diferenças significativas entre os grupos foram testadas usando o teste T não pareado ou o teste de Mann-Whitney. O teste qui-quadrado foi empregado para determinar a idade e o estágio tumoral. Valores de p significativos em negrito.

Tendo em vista, todos os dados antropométricos e bioquímicos apresentados na Tabela 5, que correspondem a fatores amplamente utilizados para o diagnóstico da caquexia levando a hipermetabolismo, angiogênese e redução da ingestão de energia. Por ensaio Luminex decidimos avaliar a expressão proteica de possíveis novos prognosticadores da síndrome, amplamente utilizados para diagnóstico de outras doenças inflamatórias (como por exemplo, doenças cardiovasculares ou COVID-19, entre outras)(BIAOXUE et al., 2016; JOHANSSON et al., 2020; GAVIN et al., 2021).

Os resultados obtidos (Figura 11) demonstraram que os pacientes caquéticos apresentam níveis diminuídos de protease de clivagem do fator de von Willebrand (ADAMTS13, p = 0,0026) e níveis aumentados de Dímero-D (p = 0,034), Proteína amilóide A sérica (SAA, p = 0139) e lipocalina associada à gelatinase neutrofílica (NGAL, p = 0,043) em comparação com o grupo WSC. Não foram observadas diferenças quando avaliamos Mioglobina, MPO, P-Selectina e sVCAM (p >0,05).



Figura 11. Prognosticadores de doenças inflamatórias

## 5.2. Análise da expressão proteica

### 5.2.1 Resposta inflamatória em pacientes caquéticos

Para a avaliação da inflamação sistêmica, foi quantificado o conteúdo de citocinas nas amostras de soro (Figura 12). Pacientes caquéticos apresentaram concentração aumentada de citocinas inflamatórias, como IL-1 $\beta$  (p = 0,0009) e IL-6 (p <0,0001), assim como da citocina anti-inflamatória IL-10 (p <0,0001). O fator quimiotático de neutrófilos IL-8, foi de maior concentração no grupo CC em relação ou grupo WSC (p = 0,005), enquanto a proteína inflamatória de macrófagos (MIP-1 $\beta$ ) foi menor (p = 0,031). Outras citocinas (IFN $\gamma$ , p = 0,723; TNF $\alpha$ , p = 0,083, MCP-1, p = 0,557; MIP-1 $\alpha$ , p = 0,656) não foram diferentes entre os grupos.

Além disso, pacientes WSC e CC apresentaram a correlação positiva esperada entre IL-1 $\beta$  e IL-6 (r = 0,496, p = 0,012; r = 0,381, p = 0,024; respetivamente). Porém, correlações positivas foram observadas apenas no CC entre MIP-1 $\beta$  e as interleucinas IL-1 $\beta$  (r = 0,381, p = 0,024) e IL-10 (r = 0,574, p = 0,0006); IL-6 e IL-8 (r = 0,762, p <0,0001) (referir-se ao painel de correlações no **APÊNDICE C**).

Dados expressos em média  $\pm$  EPM ou como mediana [1°; 3° quartil]. WSC: Câncer sem caquexia; CC: Câncer com caquexia; pg/mL; picogramas por mililitro de proteína total no soro. ADAMTS13: Protease de clivagem do fator de von Willebrand; SAA: Proteína amilóide A sérica; MPO: Mieloperoxidase; NGAL: Lipocalina Associada à Gelatinase Neutrofílica; sVCAM: Molécula de adesão da célula vascular solúvel. As diferenças significativas entre os grupos foram testadas usando o teste T não pareado ou o teste de Mann-Whitney; \* p-valor <0,05; \*\* p-valor <0,005. WSC n = 17; CC n = 11.


Figura 12. Conteúdo de citocinas e quimiocinas nas amostras de soro humano

Dados expressos em média  $\pm$  EPM ou como mediana [1°; 3° quartil]. WSC: Câncer sem caquexia; CC: Câncer com caquexia; pg/mL; picogramas por mililitro de proteína total no soro. IL: Interleucina; IFN $\gamma$ ; Interferon gama; TNF $\alpha$ : Fator de necrose tumoral alfa; MIP: Proteína inflamatória dos macrófagos; MCP: Proteína quimioatraente de monócitos. As diferenças significativas entre os grupos foram testadas usando o teste T não pareado ou o teste de Mann-Whitney; \* p-valor <0,05; \*\* p-valor <0,005; \*\*\* p-valor <0,001; \*\*\*\* p-valor <0,001. WSC n = 23-26; CC n = 32-36.

#### 5.2.2 Mudanças no perfil hormonal sistêmico decorrentes da caquexia

Com o intuito de elucidar um possível papel do perfil hormonal na patogênese da caquexia, examinamos o conteúdo de hormônios circulantes em amostras de soro de pacientes WSC e CC. A quantificação por ensaio Luminex das proteínas confirmou que os fatores anorexigênicos circulantes foram significativamente diferentes entre pacientes caquéticos e não caquéticos (Figura 13). Os níveis de amilina (p = 0,012), polipeptídeo inibidor gástrico (GIP, p = 0,013), peptídeo semelhante ao glucagon-1 (GLP-1, p = 0,035), leptina (p = 0,002) e insulina (p = 0,003) apresentam-se menores no CC em relação ao WSC. Não foram encontradas diferenças nas concentrações de C-peptídeo (p = 0,804); glucagon (p = 0,181); polipeptídeo pancreático (PP) (p = 0,396); e grelina (p = 0,359) entre pacientes WSC e CC.

Adicionalmente, realizando-se análises de correlação, observa-se que alguns hormônios se encontram linearmente relacionados em ambos os grupos, mas apenas os pacientes caquéticos apresentaram correlação positiva entre amilina e GLP-1 (r = 0,402, p = 0,021); ou amilina e leptina (r = 0,476, p = 0,004) (referir-se ao painel de correlações no **APÊNDICE D**).





Dados expressos em média  $\pm$  EPM ou como mediana [1°; 3° quartil]. WSC: Câncer sem caquexia; CC: Câncer com caquexia; pg/mL; picogramas por mililitro de proteína total no soro. GIP: Peptídeo inibidor gástrico; GLP-1: Peptídeo semelhante a Glucagon 1; PP: polipeptídeo pancreático; PYY: peptídeo YY. As diferenças significativas entre os grupos foram testadas usando o teste T não pareado ou o teste de Mann-Whitney; \* p-valor <0,05; \*\* p-valor <0,005. WSC n = 22-24; CC n = 32-35.

# 5.2.3 Alterações do conteúdo de neuropeptídios circulantes associadas à caquexia

Tendo em vista as alterações hormonais descritas acima no item 5.2.2, analisamos a concentração de neuropeptídios nas amostras de soro de pacientes WSC e CC para investigar as consequências no SNC das alterações sistémicas encontradas (Figura 14). O neuropeptídio orexigênico MCH (p = 0,010) e a  $\beta$ -endorfina opióide (p = 0,004), encontram-se diminuídas no grupo CC. Além disso, os neuropeptídios anorexígenos, como  $\alpha$ -MSH (p = 0,031), neurotensina (p = 0,033) e oxitocina (p = 0,009), mostraram-se diminuídos no CC em relação ao WSC. Orexin A (p = 0,089), Substância P (p = 0,083) e NPY (p = 0,871) não apresentaram diferenças entre os grupos. Em adição, ambos os grupos mostraram correlações positivas entre  $\beta$ -Endorfina e  $\alpha$ -MSH, neurotensina ou oxitocina entre outras. Entretanto, apenas o grupo CC mostrou correlações positivas entre  $\alpha$ -MSH e neurotensina (r = 0,555, p = 0,0004) (referir-se ao painel de correlações no **APÊNDICE E**).



Figura 14. Conteúdo de neuropeptídios nas amostras de soro humano

Dados expressos em média  $\pm$  EPM ou como mediana [1°; 3° quartil]. WSC: Câncer sem caquexia; CC: Câncer com caquexia; pg/mL; picogramas por mililitro de proteína total no soro; ng / mL; nanogramas por mililitro de proteína total no soro. α-MSH: Hormônio estimulador de α-melanócitos; NPY: neuropeptídio Y; MCH: hormônio concentrador de melanina. As diferenças significativas entre os grupos foram testadas usando o teste T não pareado ou o teste de Mann-Whitney; \* p-valor <0,05; \*\* p-valor <0,005. WSC n = 23-31; CC n = 24-38.

Após a caracterização do perfil inflamatório, hormonal e dos neuropeptídios séricos dos pacientes (acima descritas 5.2.1, 5.2.2 e 5.2.3) foi desenhado um experimento em modelo animal. As análises realizadas no Estudo 2, descrito detalhadamente á continuação, foram traçadas com o intuito de investigar a possível resposta hipotalâmica aos mediadores circulantes.

# Estudo 2 – Expressão gênica hipotalâmica de neuropeptídios e receptores de hormônios em modelo animal

# 5.3. Características gerais dos animais

Este estudo foi realizado com dois grupos de ratos Wistar: animais controle (n = 5) e animais portadores de tumor AH-130 (n = 5). O peso corporal inicial dos grupos (controle e AH-130) foi semelhante (p = 0,57). No entanto, após 7 dias da inoculação do tumor, o grupo AH-130 mostrou uma proeminente perda de peso corporal (aproximadamente -18%, p <0,0001) e redução da ingestão alimentar (p = 0,003), confirmando o estabelecimento de caquexia severa em uma semana (Tabela 6).

	CONTROLE	AH-130	p-valor
MC Inicial (g)	304,90 ± 4,27	312,00 ± 11,27	0,57
MC Final (g)	326,60 ± 5,35	293,70 ± 15,34	0,08
Perda de peso (%)	21,70± 1,51	-18,30± 4,76	< 0,0001
Ingestão alimentar (g/100g MC Inicial)	57,43 ± 1,75	47,93 ± 1,48	0,003

**Tabela 6.** Avaliações de peso corporal e ingestão alimentar dos animais

Dados expressos em média ± EPM. AH-130: ratos com tumor AH-130; MC: Massa corporal. As diferenças significativas entre os grupos foram testadas usando o teste T não pareado

- 5.4. Análise da expressão gênica por meio de RT-PCR
  - 5.4.1 Expressão gênica de neuropeptídios e receptores hormonais no hipotálamo de rato

Como observado na Tabela 7, a expressão gênica hipotalâmica do receptor de leptina (Ob Rb, p = 0,044) e do neuropeptídeo Y (NPY, p = 0,05) foi maior em ratos caquéticos portadores de tumor em relação ao grupo de controle. Embora o receptor do neuropeptídio Y (NPY R, p = 0,693); Pró-opiomelanocortina (POMC, p = 0,136); transcrito regulado pela cocaína e anfetamina (CART, p = 0,957); e o receptor do peptídeo semelhante ao glucagon-1 (GLP-1R, p = 0,401) não apresentaram diferença estatística entre os grupos.

·	5		
RT-PCR (U.A)	CONTROL	AH-130	p-value
NPY	1,012 ± 0,07	1,404± 0,16	0,05
NPY R	1,012 ± 0,08	1,058 ± 0,08	0,693
POMC	1,028 ± 0,12	0,804 ± 0,06	0,136
CART	1,008 ± 0,06	$1,004 \pm 0,04$	0,957

 $1,260 \pm 0,09$ 

0.044

Tabela 7. Expressão gênica no hipotálamo dos animais

 $1,008 \pm 0,06$ 

ObRp

GLP-1R	1,008 ± 0,06	$1,074 \pm 0,04$	0,401

Dados expressos em média  $\pm$  EPM. NPY: Neuropeptídio Y; NPY R: receptor do neuropeptídio Y; POMC: Pró-opiomelanocortina; CART: transcrito regulado pela cocaína e anfetamina; Ob Rb: Receptor de Leptina; GLP-1R: Receptor do peptídeo semelhante ao glucagon-1. A.U: unidade arbitrária; CONTROLE: n = 5; AH-130: ratos com tumor AH-130, n = 5. A significância entre os grupos foi testada usando o teste T não pareado. Valores de p significativos em negrito.

Após avaliar o conteúdo circulante de marcadores inflamatórios, hormonais e neuropeptídios nas vias periféricas de pacientes WSC e CC, procedemos a realizar análise de correlações entre os fatores, com o objetivo de detectar e esclarecer possíveis associações.

### 5.5. Relação entre parâmetros clínicos e mediadores circulantes na caquexia

Primeiramente, as medidas antropométricas e os parâmetros bioquímicos foram correlacionados com os marcadores circulantes analisadas (**APÊNDICE F**). As citocinas séricas apresentaram comportamento diferente nos pacientes avaliados [**APÊNDICE F**, (**A**)]. O grupo WSC apresentou apenas correlação positiva entre IL-8 e a perda de peso (r = 0,395, p = 0,046) e IL-10 e Hemoglobina (r = 0,495, p = 0,027). Não obstante, os pacientes caquéticos (CC) mostraram correlação positiva entre IL-10 e IMC (r = 0,438, p = 0,012), assim como entre marcadores inflamatórios: PCR e IL-8 (r = 0,497, p = 0,003), PCR e IL-6 (r = 0,363, p = 0,032), e correlação negativa entre albumina e a IL-6 (r = -0,525, p = 0,001) e a IL-8 (r = -0,421, p = 0,015).

Em segundo lugar, observamos as correlações entre os hormônios circulantes e o estado clínico dos pacientes [**APÊNDICE F, (B)**]. As concentrações de GIP no grupo WSC foram positivamente correlacionadas com MC atual (r = 0,427, p = 0,037) e albumina (r = 0,467, p = 0,025). Além disso, a leptina em pacientes WSC mostrouse positivamente correlacionada com o IMC (r = 0,610, p = 0,002) e negativamente correlacionada com a perda de peso (-0,441, p = 0,031). Embora tenhamos encontrado uma correlação positiva entre leptina e IMC (r = 0,439, p = 0,009), nenhuma outra correlação significativa foi observada no grupo CC.

Detectamos ainda várias correlações entre o conteúdo de neuropeptídios, medidas antropométricas e bioquímicas, que se mostram completamente distintas entre WSC e CC [APÊNDICE F, (C)]. No grupo WSC, a perda de peso foi negativamente correlacionada com a β-endorfina (r = -0,460, p = 0,009), neurotensina (r = -0,379, p = 0,035) e oxitocina (r = -0,424, p = 0,031); enquanto, MCH foi positivamente correlacionado com a albumina (r = 0,558, p = 0,007) e α-MSH com a hemoglobina (r = 0,389, p = 0,041). Nenhum desses achados foi observado no grupo CC. Os pacientes caquéticos mostraram correlações positivas entre a neurotensina e perda de peso (r = 0,374, p = 0,023) e negativamente, entre a MC atual (r = -0,383, p = 0,019) e o IMC (r = -0,447, p = 0,006). Também, α-MSH correlacionou-se negativamente com o IMC (r = -0,3339, p = 0,037) e positivamente a PCR (r = 0,374, p = 0,021). Esses resultados demonstram claramente diferenças nos padrões de associação dos fatores circulantes dependendo da presença ou ausência de sintomas da caquexia.

Em adição, correlações lineares foram calculadas para detectar possível associação entre os fatores inflamatórios circulantes e o perfil hormonal, bem como para compreender o *crosstalk* entre o SNC e os sinais periféricos (Figura 15). Quando se correlacionou as citocinas e os hormônios, os pacientes CC mostraram a existência de correlação negativa entre IL-1 $\beta$  e GLP-1 (r = -0,381, p = 0,038) em CC, enquanto os pacientes WSC mostraram uma correlação positiva entre os mesmos parâmetros (r = 0,730, p = 0,0002) (Figura 15A). Além disso, observamos em pacientes não caquéticos uma correlação positiva entre GLP-1 e IL-10 (r = 0,529, p = 0,024), bem como entre GLP-1 e IL-6 (r = 0,527, p = 0,017) (Figura 15A). Nenhuma relação linear foi encontrada entre citocinas e neuropeptídios no grupo CC, enquanto o WSC mostrou correlação positiva entre  $\alpha$ -MSH e MIP-1 $\beta$  (r = 0,539, p = 0,007) (Figura 15B). Finalmente, ao correlacionar hormônios e neuropeptídios, o grupo CC não mostrou nenhuma correlação, enquanto os níveis de leptina do grupo WSC exibiram correlações positivas com a  $\beta$ -endorfina (r = 0,429, p = 0,038) e a oxitocina (r = 0,593, p = 0,005) (Figura 15C).





Figura 15. Análise de correlação de proteínas circulantes em pacientes WSC e CC

(A) Correlações de citocinas e hormônios; (B) Correlações de citocinas e neuropeptídios; (C) Correlações de neuropeptídios e hormônios. Análise de correlação não paramétrica de Spearman entre variáveis biológicas. Cada gráfico de dispersão no painel corresponde ao par de variáveis indicadas nas etiquetas dos eixos horizontal e vertical. O valor do coeficiente de Spearman (ρ) é indicado pela cor de acordo com a escala de cor à direita, e os valores de p significativos encontram-se destacados em vermelho. Todos os marcadores analisados e avaliados no Estudo 1 e 2, descritos acima, têm um papel chave na regulação da homeostase energética, na regulação do apetite e influencia na ingestão alimentar. Nesse contexto, o Sistema Nervoso Central (SNC) orquestra a complexa integração desses sinais periféricos respondendo por meio da liberação de neuropeptídios específicos (MONDELLO et al., 2014). No entanto, o conhecimento sobre a participação do SNC na etiologia da síndrome é bastante escasso. Desse modo, o Estudo 3 foi proposto com o objetivo de verificar as possíveis alterações nas estruturas cerebrais decorrentes da caquexia.

# Estudo 3 - Avaliação por neuroimagem *in vivo* da morfologia, conectividade e funcionalidade do sistema nervoso central

Os resultados descritos a seguir são inéditos na área, constituindo o primeiro estudo, em nosso conhecimento, de neuroimagem *in vivo* realizado em humanos com câncer e caquexia.

A realização dos exames de neuroimagem foi conduzida em pacientes que formam parte da coorte considerada no Estudo 1. No total foram realizados 28 exames de imagem por ressonância magnética (RMI). Entretanto, 6 pacientes foram excluídos ao identificar possíveis artefato que comprometeriam as análises após o processo de verificação e checagem da qualidade.

Portanto, vinte e dois pacientes participaram do estudo e foram divididos em dois grupos: pacientes com câncer sem caquexia (WSC n=12); e pacientes com câncer e caquexia (CC n=10).

#### 5.6. Análise de imagens por ressonância magnética (RMI)

# 5.6.1 Morfometria baseada no voxel (VBM) – Diferenças de volume total cerebral

Dispostos na Tabela 8, foram calculados os volumes totais da substância cinzenta (SC), substância branca (SB), líquido cefalorraquidiano (LCR), tecidual total (TV; soma de SC+SB) e o tecidual intracraniano total (TIV; soma de SC+SB+LCR).

Não ouve diferenças significativas entre o grupo WSC e CC respeito a qualquer um dos volumes totais mensurados.

Variáveis	WSC	СС	p-valor
Volume da SC (mL)	612,0 ± 14,33	605,6 ± 10,98	0,735
Volume da SB (mL)	382,3 ± 11,04	389,2 ± 13,24	0,692
Volume do LCR (mL)	265,4 ± 24,93	270,0 ± 31,76	0,910
TV (mL)	994,3 ± 21,69	994,7 ± 22,71	0,989
TIV (mL)	1260 ± 28,60	1265 ± 43.01	0,9215

Tahola 8 Dados dos volumos totais corobrais
I ahola X I lados dos volumos totais corobrais

Dados expressos em média ± EPM ou como mediana [1º; 3º quartil]. WSC: Câncer sem caquexia; CC: Câncer com caquexia; mL: mililitros; SC: Substância cinzenta; SB: Substância branca; LCR: líquido cefalorraquidiano: TV: volume tecidual total; TIV: volume tecidual intracraniano total. As diferenças significativas entre os grupos foram testadas usando o teste T não pareado ou o teste de Mann-Whitney.

Mesmo sem achar diferenças nos valores absolutos totais cerebrais, quando realizada a análise global da substância cinzenta (**APÊNDICE G**) foi observada uma região com 311 voxels aumentada (pFWE = 0,023) nos indivíduos CC em comparação com os indivíduos WSC. A região correspondia ao córtex orbitofrontal, trato olfatório e o giro reto (coordenadas X, Y, Z = 6, 20. -24). Também, o grupo CC apresentou uma região de 156 voxels diminuída (pFWE = 0,010; coordenadas 56,0,2) que abrange estruturas como o opérculo rolândico e ínsula. Não houve diferenças significativas em relação à análise global da substância branca (pFWE>0,05; **APÊNDICE H**).

Em seguida ao estudo de volumes totais, conduzimos análises em regiões de interesse (ROIs) específicas. As ROIs selecionadas correspondem a áreas implicadas no comportamento alimentar, ingestão, regulação da homeostase e comportamento, entre outras; sendo essas, funções de alto interesse para o estudo

da síndrome da caquexia (LAVIANO et al., 2008a; GROSSBERG; SCARLETT; MARKS, 2010).

5.6.2 VBM - Diferenças de volume da substância cinzenta nas regiões de interesse (ROIs)

Quando observadas as ROIs especificas na substância cinzenta, foram achadas diversas regiões de SC com volume aumentado e diminuído no grupo CC quando comparado ao grupo WSC (dados estatísticos exibidos na Tabela 9). Houve um aumento no córtex orbitofrontal direito e esquerdo (pFWE = 0,001; pFWE = 0,005, respetivamente; Figura 16); no caudado direito e esquerdo (pFWE = 0,048; pFWE = 0,002, respetivamente; Figura 17); e no putâmen esquerdo (pFWE = 0,011; Figura 18). Além disso, a ínsula direita (pFWE = 0,025; Figura 19) e o giro temporal direito (pFWE = 0,001; Figura 20) estavam diminuídas nos indivíduos CC.

ROIs	Número de voxels	Coordenadas (x,y,z)	pFWE			
Aumentadas (CC>WSC)						
Córtex orbitofrontal D	95	(6, 20, -24)	0,001			
Córtex orbitofrontal E	31	(0, 16, -24)	0,005			
Caudado D	7	(12, 22, -8)	0,048			
Caudado E	71	(-10, 20, -8)	0,002			
Putâmen E	39	(-16, 16, -10)	0,011			
Diminuídas (CC <wsc)< th=""><th colspan="6">Diminuídas (CC<wsc)< th=""></wsc)<></th></wsc)<>	Diminuídas (CC <wsc)< th=""></wsc)<>					
Ínsula D	28	(50, 0,0)	0,025			
Giro temporal D	39	(56, 0, 2)	0,001			

Tabela 9. ROIs com diferenças de volume da substância cinzenta significativas

D: Direito; E: Esquerdo; Coordenadas (x,y,y): coordenadas do voxel de máxima significância estatística dentro de cada cluster; pFWE: p-valor para múltiplas comparações. As diferenças significativas entre os grupos foram testadas usando o teste T não pareado.



**Figura 16.** Região do córtex orbitofrontal com aumento de volume da substância cinzenta em pacientes caquéticos

A barra colorida representa o valor de T (testes post-hoc) para o voxel de significância estatística máxima dentro de cada cluster.



**Figura 17.** Região do caudado com aumento de volume da substância cinzenta em pacientes caquéticos

pacientes caqueticos

A barra colorida representa o valor de T (testes post-hoc) para o voxel de significância estatística máxima dentro de cada cluster.



**Figura 18.** Região do putâmen esquerdo com aumento de volume da substância cinzenta em pacientes caquéticos

A barra colorida representa o valor de T (testes post-hoc) para o voxel de significância estatística máxima dentro de cada cluster.



**Figura 19.** Região da ínsula direita com diminuição de volume da substância cinzenta em pacientes caquéticos

A barra colorida representa o valor de T (testes post-hoc) para o voxel de significância estatística máxima dentro de cada cluster.



**Figura 20.** Região do giro temporal direito com diminuição de volume da substância cinzenta em pacientes caquéticos A barra colorida representa o valor de T (testes post-hoc) para o voxel de significância

A barra colorida representa o valor de T (testes post-hoc) para o voxel de significância estatística máxima dentro de cada cluster.

Em adição, decidimos investigar como estas alterações morfológicas (aumento e diminuição) na substância cinzenta dos pacientes caquéticos poderiam decorrer ou surgir em paralelo, a todas as alterações dos dados antropométricos, de fatores bioquímicos e do conteúdo proteico circulante de citocinas mostrado no Estudo 1. Desse modo, realizamos análises de correlação entre o volume das ROI e os dados clínicos e os fatores analisados no soro dos próprios pacientes que realizaram o exame de neuroimagem. Como pode se observar na Figura 21, os padrões de correlações entre os volumes das regiões e os marcadores avaliados diferem completamente entre os pacientes WSC e CC.

Considerando os dados antropométricos, o grupo WSC não apresenta nenhuma correlação (p>0,05) com os volumes das ROI. No entanto, foram observadas no grupo CC correlações negativas entre a MC atual e os volumes das ROI a seguir: amígdala esquerda (E) (r = -0,928; p = 0,0003); amígdala Direita (D) (r = -0,783; p = 0,017); córtex orbitofrontal E (r = -0,695; p = 0,038); córtex orbitofrontal D (r = -0,762; p = 0,017); giro temporal E (r = -0,837; p = 0,005); giro temporal D (r = -0,762; p = 0,017); cortex orbitofrontal E (r = -0,837; p = 0,005); giro temporal D (r = -0,762; p = 0,017); giro temporal E (r = -0,837; p = 0,005); giro temporal D (r = -0,762; p = 0,017); giro temporal E (r = -0,837; p = 0,005); giro temporal D (r = -0,762; p = 0,017); giro temporal E (r = -0,837; p = 0,005); giro temporal D (r = -0,762; p = 0,017); giro temporal E (r = -0,837; p = 0,005); giro temporal D (r = -0,762; p = 0,017); giro temporal E (r = -0,837; p = 0,005); giro temporal D (r = -0,762; p = 0,017); giro temporal E (r = -0,837; p = 0,005); giro temporal D (r = -0,762; p = 0,017); giro temporal E (r = -0,837; p = 0,005); giro temporal D (r = -0,762; p = 0,017); giro temporal E (r = -0,837; p = 0,005); giro temporal D (r = -0,762; p = 0,017); giro temporal D (r = -0,762; p = 0,017); giro temporal E (r = -0,837; p = 0,005); giro temporal D (r = -0,762; p = 0,017); giro temporal E (r = -0,837; p = 0,005); giro temporal D (r = -0,762; p = 0,017); giro temporal E (r = -0,837; p = 0,005); giro temporal D (r = -0,762; p = 0,017); giro temporal E (r = -0,762; p = 0,017); giro temporal E (r = -0,762; p = 0,017); giro temporal E (r = -0,762; p = 0,005); giro temporal D (r = -0,762; p = 0,017); giro temporal E (r = -0,762; p = 0,017); giro temporal E (r = -0,762; p = 0,017); giro temporal E (r = -0,762; p = 0,017); giro temporal E (r = -0,762; p = 0,017); giro temporal E (r = -0,762; p = 0,017); giro temporal E (r = -0,762; p = 0,017); giro temporal E (r = -0,762; p = 0,017); giro temporal E (r = -0,762; p = 0,017); giro temporal E (r =

-0,921; p = 0,0004); giro frontal (r = -0,821; p = 0,007) e hipotálamo E (r = -0,711; p = 0,032).

Tendo em vista os fatores bioquímicos e os volumes das ROI, exclusivamente encontramos a correlação positiva entre albumina e a alteração no córtex orbitofrontal E no grupo WSC (r = 0,733; p = 0,021). Não foram observadas diferenças significativas no grupo CC para estes parâmetros (p>0,05).

Em seguida, avaliamos a correlação entre os volumes das ROI e o conteúdo de citocinas circulantes. No grupo WSC foram observadas correlações significativamente positivas entre o IFN $\gamma$  e amígdala E (r = 0,762; p = 0,037); IFN $\gamma$  e amígdala D (r = 0,786; p = 0,028); e IFN $\gamma$  e lobo occipital (r = 0,762; p = 0,038). No entanto, o grupo CC apresentou correlações negativas com o conteúdo de IL-8 no caudado esquerdo (r = -0,733; p = 0,031) e direito (r = -0,683; p = 0,050).



**Figura 21.** Análise de correlação entre o volume dos ROIs e os dados antropométricos, fatores bioquímicos e marcadores inflamatórios circulantes em pacientes WSC e CC

D: Direito; E: Esquerdo; C: Córtex; SMI: Superior, Médio e Inferior. Análise de correlação não paramétrica de Spearman entre variáveis biológicas. Cada gráfico de dispersão no painel corresponde ao par de variáveis indicadas nas etiquetas dos eixos horizontal e vertical. O valor do coeficiente de Spearman (ρ) é indicado pela cor de acordo com a escala de cor à direita.

# 5.6.3 VBM - Diferenças de volume da substância branca nas regiões de interesse (ROIs)

As regiões de interesse em que avaliamos a substância branca não apresentaram nenhuma diferença estatística (pFWE>0,05).

5.6.4 Imagem por tensores de difusão (DTI) - Diferenças nos valores da anisotropia fracionada

Não houve diferenças nos valores da anisotropia fracionada mensurados por DTI entre os grupos CC e WSC (**APÊNDICE I**).

5.6.5 Imagens de espectroscopia (MRS) focalizadas no hipotálamo

De um total de 22 espectros obtidos, apenas 14 espectros (WSC=6, CC=8) atenderam aos critérios de qualidade estabelecidos e foram considerados para análise posterior. O alto número de espectros de baixa qualidade excluídos (n = 8) está relacionado à localização do hipotálamo, que é muito difícil de localizar e geralmente leva a um ajuste não ideal do equipamento.

Com tudo, esta análise exploratória não demonstrou diferenças nos metabólitos avaliados, listados na Tabela 10.

Razões	WSC	сс	p-valor
Glu/Cr	0,939 ± 0,08	08 1,053 ± 0,15	
Glx/Cr	1,567± 0,12	1,833 ± 0,17	0.294
NAA/Cr	0,788 ± 0,09	0,977 ± 0,10	0,214
ml/Cr	1,022 ± 0,11	1,039 ± 0,12	0,921
GPC+PCh/Cr	0,352 ± 0,03	0.355 ± 0,01	0,931

Tabela 10. Resultados da MRS no hipotálamo de indivíduos WSC e CC

Dados expressos em média ± EPM. WSC: Câncer sem caquexia; CC: Câncer com caquexia Cr: creatina; Glu: glutamato; Glx: soma de glutamato e glutamina; NAA: N-acetilaspartato; ml:

mioinositol. GPC + PCh: soma de glicerofosfocolina (GPC) e fosfocolina (PCh). As diferenças entre os grupos foram testadas usando o teste T.

5.6.6 Resting state Ressonância magnética funcional em repouso (resting state fRMI):

Avaliamos o efeito da caquexia na conectividade funcional (FC) em estado de repouso. As diferenças na FC, entre os grupos WSC e CC foram examinadas em um total de 31 regiões de interesse. A seleção das ROIs foi realizada, com base em áreas nas quais a caquexia poderia estar causando alterações e considerando os resultados preliminares obtidos pela técnica de VBM (descrita acima no item 5.6.2).

Os dados apresentados a seguir, consistem na avaliação de mudanças na FC usando análise ROI-to-ROI, ou seja, foi estudada a força com que as regiões de interesse estão conectadas. Quando comparado o grupo WSC e CC, o grupo CC apresentou diferenças na conectividade funcional (positivas e negativas) entre as regiões, ilustradas na Figura 22 (A-M) e os valores estatísticos listados na Tabela 11. Entendendo positivas como aumentadas no grupo CC em comparação ao grupo WSC, assim como negativas correspondem a diminuídas no CC comparado a WSC. No total, os pacientes caquéticos mostraram 25 conexões negativas e 5 conexões positivas com diferenças estatísticas significativas (pFDR<0,05).





**Figura 22.** Alterações da FC nas análises ROI-to-ROI em pacientes com caquexia D: Direito; E: Esquerdo; Sup.: Superior; Inf.: Inferior; Post.: Posterior.; Ant.: Anterior; RPFC: Córtex Pré-Frontal Direito. FC negativas mostradas em azul e FC positivas em vermelho.

ROIs	FC negativa	pFDR	FC positiva	pFDR
	[número de voxels (x,y,z)]	•	[número de voxels (x,y,z)]	•
Núcleo accumbens D	[189 (+32, -70, +24)]: Lobo occipital lateral Sup. D	0,0017		
	[185 (+26, -68, +44)]: Lobo occipital lateral Sup. D	0,0017		
	[101 (-20, -80, +20)]: Lobo occipital lateral Sup. e Inf. E	0,0260		
	[84 (-36, -46, +50)]: Lobo parietal Sup. E; Giro	0,0385		
	supramarginal Post. E.			
	[101 (-20, -80, +20)]: Lobo occipital lateral Sup. E; Lobo	0,0260		
	parietal Sup. E			
Putâmen E	[238 (-06, -46, +54)]: Pré-cúneo; Giro pós-central D/E	0,0011	[144 (-16, -84, -06)]: Giro fusiforme	0,0107
			Occipital E; Giro lingual E; córtex	
			intracalcarino E	
	[104 (+60, -34, +52)]: Giro supramarginal Ant. e Post.	0,0304	[91 (-08, -56, -14): Cerebelo, Vermis	0,0379
	D; Giro pos-central D			0.0420
			[03 (+34, -02, -14)]. LODO OCCIPITAL IATERAL	0,0420
Ínculo E	[217 ( 26 42 426)]: Gire cinquiado Post	0.0047		
	[217 (-20, -42, +30)], Giro paracingulado POSI.	0,0047		
	$[110, (\pm 12, \pm 08, \pm 30)]$ . Giro cinculado Ant: giro	0,0000		
	paracingulado D/E	0,0002		
Ínsula D	[114(-14, -42, +50)]: Giro pós-central E; Pré-cúneo	0,0381		
	[111 (-02, +14, +52)]: Giro paracingulado E; Giro frontal	0,0381		
	Sup. E			
Network Saliencia	[150 (-36, +24, -06)]: Ínsula E, Córtex orbitofrontal E.	0,0311		
Insula Ant. D	opérculo frontal E			
Network Saliencia -	[158 (+22, -82, -28)]: Cerebelo D	0,0105		
RPFC D				
Giro para-hipocampal			[191 (+42, -76, +18)]: Lobo occipital	0,0019
Post. D			lateral, Sup. e Inf. D	

 Tabela 11. Valores estatísticos das alterações na força de conectividade entre as ROIs de pacientes caquéticos

Giro temporal Sup., Ant. D	[170 (-52, -04, +54): Giro pré-central E, Giro frontal médio E	0,0099		
Giro temporal Sup., Post. E	[130 (-58, -20, -18): Giro temporal médio Post. E; Giro temporal Inf., Post. E	0,0103		
Giro temporal médio, Ant. D	[113 (+24, -56, +04)]: Giro lingual D, Pré-cúneo	0,0480		
Giro temporal médio, temporo-occipital E	[133 (+40, +20, +30)]: Giro frontal médio D; Giro frontal Inf. pars opercularis e triangularis D	0,0228		
Giro temporal Inf., temporo-occipital D	[202 (+14, +48, +40)]: Polo frontal D/E Giro frontal Sup. D/E	0,0058		
	[155(-10, +12, +64)]: Giro frontal Sup. E	0,0100		
Giro temporal Inf., temporo-occipital E			[131 (+28, -40, +18)]	0,0356

D: Direito; E: Esquerdo; Sup.: Superior; Inf.: Inferior; Post.: Posterior.; Ant.: Anterior; RPFC: Córtex Pré-Frontal Direito. Coordenadas (x,y,y): coordenadas do voxel de máxima significância estatística dentro de cada cluster; pFDR: corrigidos para comparação múltipla usando a taxa de descoberta falsa (FDR). As diferenças significativas entre os grupos foram testadas usando o teste T não pareado.

# Estudo 4: Análise neuropatológica de tecido cerebral post-mortem de pacientes com caquexia

Os resultados descritos a seguir, são inéditos na área constituindo o primeiro estudo, em nosso conhecimento, de neuropatologia realizado *post-mortem* em tecido humano com câncer e caquexia.

# 5.7. Características gerais dos pacientes – Coorte Oxford Brain Bank

Vinte e seis pacientes (10 Controle, 6 WSC e 10 CC) foram avaliados. As características gerais dos pacientes estudados estão listadas na Tabela 12 (disponibilizado no **APÊNDICE J** os relatórios clínicos originais em inglês). Não houve diferenças nas distribuições de sexo (p = 0,8835), idade (p = 0,9468), estágio tumoral (p = 0,5896) ou intervalo pós-morte (PMI, p = 0,4108).

	CONTROLE	WSC	CC	p-valor
Ν	10	6	10	
Sexo (M:F)	4:6	3:3	5:5	0,8835
Idade	82,7 ± 2,37	82,67 ± 3,33	84,2 ± 2,28	0,8841
Estágio tumoral: (Não-metastático: metastático)		2:4	3:7	0,8892
PMI (horas)	64,1± 11,26	44,33 ± 10,86	49,1 ± 8,64	0,3956

**Tabela 12.** Características gerais da coorte procedente do Oxford Brain Bank

Dados expressos em média ± EPM ou como mediana [1º; 3º quartil]. N: tamanho da amostra; WSC: Câncer sem caquexia; CC: Câncer com caquexia; PMI: Intervalo pós-morte. As diferenças significativas entre os grupos foram testadas usando os testes *One-way* ANOVA ou Kruskal-Wallis, seguido quando apropriado por testes post-hoc. O teste qui-quadrado foi empregado para determinar a idade e o estágio tumoral.

Os pacientes com câncer e caquexia foram classificados por meio de prontuários clínicos que registravam: perda de peso, anemia, hipoalbuminemia, anorexia, fragilidade física, emagrecimento ou emaciação, de acordo com os critérios de diagnóstico da caquexia propostos por Evans *et al.* 2008 (EVANS et al., 2008). Todos os casos dos grupos (Controle, WSC e CC) não apresentaram evidências de comprometimento cognitivo avaliado pelas análises de neuropatologia CERAD

(Consórcio para Estabelecer um Registro da Doença de Alzheimer) e Braak (Estágio de emaranhados neurofibrilares) (**APÊNDICE J**).

Todas as análises descritas a seguir foram realizadas em cada área de interesse (caudado, putâmen, amígdala, hipotálamo, tálamo e hipocampo), tendo o material sido extraído de cérebros *post-mortem* inteiros fixados.

### 5.8. Análises neuropatológicas

### 5.8.1 Morfologia neuronal e densidade neuronal

As lâminas coradas com hematoxilina e eosina (H&E) foram avaliadas de forma qualitativa e observamos que os pacientes caquéticos apresentaram neurônios com citoplasma encolhido e núcleos escuros, às vezes picnóticos (referir-se a Figura 23, setas pretas). Além disso, foi analisada a densidade neuronal de forma quantitativa [contagem de neurônios por área (mm<sup>2</sup>)] e observamos diferenças significativas entre os grupos usando os testes *One-way* ANOVA ou Kruskal-Wallis (p<0,05) (descritos na Tabela 13). Em seguida, foram realizadas as análises *post-hoc* para especificar as diferenças entre os grupos (Figura 24). No grupo CC, a densidade neuronal encontrase aumentada na amígdala (p = 0,023; Figura 24C) e hipotálamo (p = 0,037; Figura 24G) em comparação com o grupo controle. Também, os pacientes WSC apresentaram um aumento da densidade neuronal no hipotálamo em comparação ao grupo controle (p = 0,037; Figura 24G). Não houve diferença significativa na densidade neuronal entre no caudado, putâmen, tálamo ou subcampos CA1 e CA3 nos grupos (Figura 24 A, B, D, E, F).





wsc

Figura 23. Análise qualitativa da morfologia dos neurônios

Controle

Imagens de microscopia óptica com aumento de 400x. WSC: Câncer sem caquexia; CC: Câncer com caquexia; CA3: região CA3 do hipocampo; CA1: região CA1 do hipocampo.  $\rightarrow$  mostrando estruturas neuronais alteradas.

neurônios/mm <sup>2</sup>	CONTROLE	WSC	CC	p-valor
Caudado	303 ± 24	271 ± 35	274 ± 19	0,673
Putâmen	240 ± 16	206 ± 16	258 ± 18	0,172
Amígdala	123 ± 8	$146 \pm 15$	$173\pm16$	0,027
Hipocampo (região CA3)	203 ± 18	232 ± 17	200 ± 11	0,395
Hipocampo (região CA3)	175 ± 8	161 ± 10	176 ± 15	0,660
Tálamo	79 ± 7	75 ± 7	$80\pm5$	0,108
Hipotálamo	72 ± 9	122 ± 21	117 ± 9	0,018

Tabela 13. Densidade neuronal (neurônios/mm<sup>2</sup>) dos grupos de estudo

Dados expressos em média  $\pm$  EPM ou como mediana [1°; 3° quartil]. WSC: Câncer sem caquexia; CC: Câncer com caquexia. As diferenças significativas entre os grupos foram testadas usando os testes *One-way* ANOVA ou Kruskal-Wallis. Valores de p significativos em negrito. CONTROLE n=7-10; WSC n= 6; CC n=9-10.



Figura 24. Testes post-hoc entre os grupos para a densidade neuronal

WSC: Câncer sem caquexia; CC: Câncer com caquexia. As diferenças significativas indicadas entre os grupos foram testadas usando os testes post-hoc Tukey ou Teste de Dunn.

#### 5.9. Perfil das células da neuróglia

## 5.9.1 Quantificação de micróglia/macrófagos por meio de imunohistoquímica

Os diferentes fenótipos microgliais foram avaliados usando os marcadores Iba1 e CD68 (referir-se as imagens para cada ROI no **APÊNDICE K e L**, respetivamente). A marcação de Iba 1, que é expressa no cérebro exclusivamente pelas células da microglia, apresentou no hipotálamo uma tendência de aumento (p = 0,052) comparando os grupos controle, WSC e CC. Não foram encontradas diferenças significativas nas outras regiões de interesse quando comparados todos os grupos (valores descritos na Tabela 14).

lba1	CONTROLE	WSC	сс	p-valor
Caudado	0,91 ± 0,29	0,85 ± 0,28	0,64 ± 0,26	0,767
Putâmen	0,27 [0,08;0,67]	0,33 [0,02;0,70]	0,07 [0,02;0,16]	0,124
Amígdala	0,90 ± 0,19	0,83 ± 0,25	1,02 ± 0,37	0,896
CA3	1,02 ± 0,16	0,55± 0,13	0,68± 0,19	0,142
CA1	0,83 ± 0,13	0,52 ± 0,12	0,91 ± 0,23	0,294
Tálamo	1,12 ± 0,36	0,85 ± 0,38	0,80 ± 0,20	0,730
Hipotálamo	0,79 [0,31;1,18]	0,16 [0,13;0,45]	0,36 [0,26;0,64]	0,052

Dados expressos em média ± EPM ou como mediana [1º; 3º quartil]. WSC: Câncer sem caquexia; CC: Câncer com caquexia; CA3: região CA3 do hipocampo; CA1: região CA1 do hipocampo. As diferenças significativas entre os grupos foram testadas usando os testes *One-way* ANOVA ou Kruskal-Wallis. Valores de p significativos em negrito. CONTROLE n= 8-10; WSC n=5-6; CC n= 7-10.

Tampouco foram encontradas diferenças quando avaliada a positividade do marcador CD68, que é regulado positivamente em células da micróglia ativamente fagocíticas nas regiões do cérebro de interesse entre os grupos (valores descritos na Tabela 15).

CD68	CONTROLE	wsc	сс	p-valor
Caudado	0,15± 0,04	0,10 ± 0,02	0,12 ± 0,04	0,656
Putâmen	0,20 ± 0,04	0,12 ± 0,03	0,18± 0,06	0,529
Amígdala	0,22 [0,09;0,34]	0,11 [0,03;0,38]	0,16 [0,01;1,05]	0,783
CA3	0,26 ± 0,06	0,15 ± 0,03	0,21 ± 0,04	0,409
CA1	0,24 ± 0,05	0,22 ± 0,06	0,26 ± 0,05	0,910
Tálamo	0,15 [0,07;0,32]	0,14 [0,02;0,16]	0,23 [0,01;0,55]	0,175
Hipotálamo	0,04 ± 0,008	0,02 ± 0,006	0,03 ± 0,008	0,317

Tabela 15. Análise quantitativa da positividade de CD68

Dados expressos em média ± EPM ou como mediana [1º; 3º quartil]. WSC: Câncer sem caquexia; CC: Câncer com caquexia; CA3: região CA3 do hipocampo; CA1: região CA1 do hipocampo. As diferenças significativas entre os grupos foram testadas usando os testes *One-way* ANOVA ou Kruskal-Wallis. Valores de p significativos em negrito. CONTROLE n= 7-10; WSC n= 5-6; CC n= 7-10.

No entanto, quando calculada a razão CD68/Iba1 (valores apresentados na Tabela 16, considerando as medidas quantitativas de CD68 e Iba1) os pacientes caquéticos apresentaram valores significativamente maiores na região do caudado em comparação ao grupo WSC (p = 0,048; Figura 25). Quando os valores da razão CD68/Iba1 apresentam-se níveis maiores, indicam um aumento da atividade fagocítica (CD68) em relação à densidade total da micróglia (Iba1).

Razão CD68/Iba1	CONTROLE	wsc	сс	p-valor
Caudado	0,28 [0,09;0,37]	0,10 [0,07;0,14] #	0,34 [0,21;1,15] #	0,048
Putâmen	0,91 [0,12;1,55]	0,41 [0,21;3,84]	1,72 [0,78;19,97]	0,189
Amígdala	0,24 [0,07;0,54]	0,18 [0,12;2,18]	0,08 [0,05;0,59]	0,602
CA3	0,23 [0,09;0,39]	0,25 [0,14;0,28]	0,40 [0,12;1,40]	0,137
CA1	0,23 [0,14;0,49]	0,38 [0,22;0,44]	0,44 [0,13;3,62]	0,725
Tálamo	0,12 [0,06;0,92]	0,21 [0,14;0,34]	0,17 [0,11;0,43]	0,939
Hipotálamo	0,06 [0,03;0,16]	0,06 [0,02;0,15]	0,03 [0,07;0,06]	0,1681

Tabela 16. Análises quantitativas da razão CD68/Iba1

Dados expressos em média ± EPM ou como mediana [1°; 3° quartil]. WSC: Câncer sem caquexia; CC: Câncer com caquexia; CA3: região CA3 do hipocampo; CA1: região CA1 do hipocampo. As diferenças significativas entre os grupos foram testadas usando os testes *One-way* ANOVA ou Kruskal-Wallis. # Diferenças significativas entre WSC e CC. Valores de p significativos em negrito. CONTROLE n= 7-10; WSC n= 5-6; CC n= 7-10.



Figura 25. Razão CD68/Iba1 no caudado dos grupos estudados

Imagens de microscopia óptica com aumento de 400x. WSC: Câncer sem caquexia; CC: Câncer com caquexia. CONTROLE n=7-10. WSC n=5-6. CC n=7-10.

# 5.9.2 Quantificação dos astrócitos por meio de imunohistoquímica

Para quantificar os astrócitos foi utilizado o marcador GFAP (proteína glial fibrilar ácida) que é específico para esta população glial. De forma qualitativa foi observado que os pacientes caquéticos mostram padrões diferentes em relação aos grupos WSC e Controle, com aumento de astrócitos (GFAP+) na região perivascular (Figura 26).



**Figura 26.** Análise qualitativa dos astrócitos GFAP+ nas regiões perivasculares Imagens de microscopia óptica com aumento de 100x. WSC: Câncer sem caquexia; CC: Câncer com caquexia.

Quantitativamente, a marcação de GFAP hipotalâmica encontra-se aumentada no grupo CC em relação a WSC (p = 0,029; Figura 27). Também, GFAP foi maior no caudado (p = 0,038) e na amígdala (p = 0,045) dos pacientes CC em comparação com o grupo Controle (Figura 27) (valores apresentados na Tabela 17). Nenhuma diferença foi encontrada no putâmen, regiões do hipocampo e tálamo (p>0,05) (por favor, encontre as imagens no **APÊNDICE M**).

GFAP	CONTROLE	WSC	СС	p-valor
Caudado	$3,36 \pm 0,59$ *	3,57± 1,78	6,06± 0,42 *	0,038*
Putâmen	5,54 ± 1,21	3,99 ± 1,92	4,76± 1,03	0,737
Amígdala	2,99 ± 0,67 *	5,17±1,72	6,89± 0,95 *	0,045*
CA3	8,86 ± 1,23	6,62±0,98	8,25± 0,86	0,395

|--|

CA1	5,29± 0,76	5,21±0,82	5,94± 0,42	0,713
Tálamo	8,85± 1,09	6,07± 1,89	9,39± 1,19	0,242
Hipotálamo	6,39± 1,18	5,27± 0,97 #	9,06± 0,72 #	0,029#

Dados expressos em média ± EPM ou como mediana [1°; 3° quartil]. WSC: Câncer sem caquexia; CC: Câncer com caquexia; CA3: região CA3 do hipocampo; CA1: região CA1 do hipocampo. As diferenças significativas entre os grupos foram testadas usando os testes *One-way* ANOVA ou Kruskal-Wallis. \*Diferenças significativas entre controle e CC. # Diferenças significativas entre WSC e CC. Valores de p significativos em negrito. Valores de p significativos em negrito. CONTROLE n= 8-10; WSC n= 5-6; CC n= 8-10.



Figura 27. Marcação GFAP com diferença estatística nas ROI específicas

Imagens de microscopia óptica com aumento de 400x. WSC: Câncer sem caquexia; CC: Câncer com caquexia. CONTROLE n= 8-10; WSC n= 5-6; CC n= 8-10.

#### 5.10. Análise semi-quantitativa da via mTOR nas ROI

Baseado na literatura, a desregulação da via do mTOR tem um impacto negativo no SNC levando a morte neural, declínio cognitivo e danos cerebrais em doenças como Alzheimer ou Parkinson (LAPLANTE et al., 2012; PALAVRA; AMBROSIO; REIS, 2016). Tendo em vista o papel crucial da via do mTOR no funcionamento do SNC, foi realizado uma análise semi-quantitativa das proteínas relacionadas a via do mTOR (TSC1, TSC2, mTOR, pmTOR, S6K e pS6K) (todas as avaliações realizadas na via do mTOR encontram-se nas Figura 28). As análises foram realizadas no caudado, putâmen, amigdala, tálamo e hipotálamo para avaliar uma possível contribuição da via nas alterações observadas no SNC em função da presença da caquexia. O hipocampo foi desconsiderado por não um mínimo de 3 amostras por grupo analisado. Para ver as escalas de pontuação aplicadas para as avaliações de cada região, por favor referir-se aos itens 4.20.2 e **APÊNDICE A**.

As análises semi-quantitativas dos marcadores *upstream* da via mTOR demonstraram que o TSC1 se encontra mais alto no putâmen do grupo CC quando comparado ao grupo WSC (p = 0,042). Não foram encontradas outras diferenças no conteúdo TSC1 nas outras ROI entre os grupos de estudo (p > 0,05). Para a marcação de TSC2 foi observado no hipotálamo um maior valor no grupo Controle em relação ao grupo WSC (p = 0,021) e CC (p = 0,0002).

Nas semi-quantificações realizadas para avaliar o conteúdo de mTOR, o mesmo mostrou-se mais elevado no putâmen (p = 0,045) e na amígdala (p = 0,035) do grupo CC em relação ao grupo WSC. Também, a marcação de pmTOR no grupo caquético foi significativamente maior na amígdala em relação à do grupo Controle (p = 0,038) e à do grupo WSC (p = 0,045). No putâmen do grupo CC, a pmTOR mostrou detecção mais alta em relação a o grupo WSC (p = 0,043). Além disso, os grupos CC (p = 0,001) e WSC (p = 0,0003) mostram um aumento de pmTOR no tálamo, em comparação ao grupo controle.

Para os marcadores *downstream* da via mTOR foi observado que S6K e pS6K não apresentam diferenças significativas entre os grupos ou regiões de interesse (p> 0,05).





Figura 28. Análise semi-quantitativa da via mTOR

Dados expressos em média ± EPM. WSC: Câncer sem caquexia; CC: Câncer com caquexia; TSC1: Hamartina; TSC2: Tuberina; mTOR: via do alvo mecanístico da rapamicina; pmTOR: mTOR fosforilada; S6K: proteína ribossomal S6 quinase e pS6K: S6K fosforilada. As diferenças significativas entre os grupos foram testadas usando o teste *One-way* ANOVA. CONTROLE n= 6-10; WSC n= 4-6; CC n= 6-10.

# Discussão

### 6. DISCUSSÃO

A caquexia é uma síndrome metabólica devastadora, multiorgânica e sistêmica que leva à perda progressiva e involuntária de massa magra e encontra-se subjacente a doenças crônicas tais como a AIDS (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida), a sepse, a DPOC (doença pulmonar obstrutiva crônica), doenças cardíacas e câncer (EVANS et al., 2008; FEARON et al., 2011; BARACOS; MAZURAK; BHULLAR, 2019). A perda de peso corporal e de músculo características da síndrome não podem ser completamente revertidas pelo suporte nutricional convencional e estão associadas à deterioração funcional progressiva e à mortalidade (BARACOS et al., 2018). A caquexia quando associada ao câncer chega a se manifestar em dois de cada três pacientes com câncer avançado e é responsável direta pelo óbito de 20 a 40% dos pacientes que a apresentam (sendo a causa de aproximadamente 3 a 4 milhões de mortes anualmente) (MUSCARITOLI et al., 2017; BARACOS et al., 2018; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020).

No câncer, os distúrbios metabólicos associados à síndrome são desencadeados por fatores produzidos pelo tumor e por fatores secretados pelo hospedeiro de forma sistêmica, ocasionando inflamação sistêmica, catabolismo excessivo e balanço energético negativo (SEELAENDER et al., 2015; PORPORATO, 2016; WYART et al., 2020). Estudos recentes e trabalhados realizados pelo grupo em pacientes com câncer e caquexia mostraram inúmeras alterações no tecido muscular esquelético, no tecido adiposo, no microambiente tumoral e no trato gastrointestinal, entre outros (DE MATOS-NETO et al., 2015; NEVES et al., 2016; COSTA et al., 2019; DE CASTRO et al., 2019; LIMA et al., 2019). Adicionalmente, trabalhos publicados em modelo animal mostraram distúrbios no sistema nervoso central (SNC), como neuroinflamação e perfil alterado da micróglia (LIRA et al., 2011; MOLFINO et al., 2015; BURFEIND et al., 2020b). Foi ainda amplamente demonstrada a importância do SNC na integração de sinais sistêmicos pelo SNC para a regulação do apetite e do peso corporal (UETA et al., 2007; PATRA; ARORA, 2012). No entanto, entre os órgãos afetados pela síndrome, o SNC carece de estudos experimentais em humanos, em nosso conhecimento.

Desse modo, tendo em vista o papel primordial que exerce o SNC na homeostase energética e na ingestão alimentar, tornou-se necessário realizar um estudo mais amplo das possíveis alterações no SNC associadas à caquexia em humanos. O objetivo do presente trabalho foi realizar o primeiro estudo, ao nosso conhecimento, de neuroimagem *in vivo* e análises neuropatológicas *post-mortem* em pacientes com câncer e caquexia. Adicionalmente, para entender melhor a comunicação entre os sistemas central e periférico caracterizou-se o conteúdo de marcadores inflamatórios, hormônios e neuropeptídios circulantes nos pacientes.

Para avaliar e caracterizar a caquexia (o diagnóstico ainda é alvo de controvérsia) na nossa coorte, considerou-se a definição proposta por Evans et al. 2008 (descrita acima no item 2.2), que propõe como critérios para diagnóstico a perda de peso involuntária, anorexia, anemia, hipoalbuminemia e inflamação sistêmica (EVANS et al., 2008; FEARON et al., 2011). Os resultados obtidos da avaliação dos dados antropométricos e bioquímicos dos pacientes recrutados para este estudo mostram que a coorte foi homogênea com referência à altura e idade; no entanto, os pacientes com caquexia (CC) apresentaram severa perda de peso nos 6 meses que antecederam o recrutamento. O grupo CC manifestou anorexia e concentração alterada de fatores bioquímicos circulantes (inflamação sistêmica, anemia e mau estado nutricional). A inflamação sistêmica decorrente da caquexia associada ao câncer foi confirmada nos pacientes CC que apresentaram concentração elevada de proteína C reativa (PCR) circulante (PCR> 5 mg/L). A PCR está positivamente correlacionada à atividade de citocinas pró-inflamatórias e diretamente implicada na perda de massa muscular (FALCONER et al., 1995; ARGILÉS et al., 2005; DEANS; WIGMORE, 2005; GHUMAN et al., 2017). Também, foi observado que o conteúdo de albumina (<3,2 g/dL) e o de hemoglobina (Hb <12 g/dL) era baixo nos pacientes CC, sendo os mesmos sinais amplamente aceitos de desnutrição e anemia, respectivamente (BLUM et al., 2011). O estágio tumoral não diferiu entre os pacientes sem caquexia (WSC) e os pacientes com caquexia (CC), corroborando a suposição de Petruzzelli et al. 2014 e em concordância com trabalhos do nosso grupo que demostram que a caquexia pode se manifestar em estágios iniciais (I-II) do câncer e é independente da gravidade nos achados patológicos no câncer colorretal (PETRUZZELLI et al., 2014; MCSORLEY et al., 2018; LIMA et al., 2019) Além disso, a avaliação do questionário FAACT-ESPEN mostrou que o grupo CC apresenta anorexia, diretamente relacionada à perda de peso.
Dessa forma, observamos que o grupo CC apresentou os principais critérios de diagnóstico da síndrome, conforme aqueles estipulados por EVANS et al. 2008. No entanto, cientes da necessidade da comunidade científica em atualizar a definição e os critérios de diagnóstico, sobretudo para a detecção precoce da caquexia, buscou-se avaliar também na nossa coorte, o conteúdo sérico de fatores amplamente utilizados para diagnóstico de outras doenças inflamatórias (BIAOXUE et al., 2016; JOHANSSON et al., 2020; GAVIN et al., 2021). Entre os fatores avaliados, observamos alta concentração de proteína amilóide A sérica (SAA) associados à caquexia. A SAA é uma proteína de fase aguda que estimula a produção de citocinas pro-inflamatórias, cuja detecção é mais conclusiva do que a PCR em pacientes com câncer pulmonar, infecções virais, pancreatite aguda grave ou doenças autoimunes (BIAOXUE et al., 2016; GAO; YAN; ZHANG, 2018; ZHANG et al., 2019). Além disso, o grupo CC apresentou baixa expressão de ADAMTS13 e alta concentração de Dímero-D, que são fatores de risco intravascular e estão associados ao aumento do risco de doença trombótica e inflamação sistêmica (REDDEL et al., 2017; MASIAS; CATALAND, 2018; WANG et al., 2020). Portanto, SAA, ADAMTS13 e Dímero-D podem estar impulsionando a progressão da síndrome (ou refletir esse processo). Tendo em vista que esses fatores se mostram alterados em estágios iniciais de inúmeras doenças, os mesmos podem oferecer potencial como prognosticadores da caquexia precoce.

Continuando a avaliação da resposta inflamatória associada à caquexia, intimamente relacionada à produção de proteínas de fase aguda, nossos achados apontam que pacientes caquéticos apresentam maior expressão de marcadores inflamatórios como IL-1β, IL-6, bem como maior conteúdo circulante de fatores antiinflamatórios, como IL-10 ou fator quimiotático de neutrófilos IL-8. A literatura mostra que a concentração de interleucina 8 se correlaciona com alteração no número de neutrófilos e eosinófilos na caquexia, enquanto os pacientes WSC não apresentam este sintoma (FUJISHIMA; AIKAWA, 1995; PROCTOR et al., 2011). O equilíbrio entre citocinas pró e anti-caquéticas contribui para importantes processos moleculares, tais como emaciação, evasão imunológica, supressão do apetite, fibrose e progressão tumoral (DE MATOS-NETO et al., 2015; ARGILÉS et al., 2018; LIMA et al., 2019). Várias estratégias terapêuticas para a reversão da síndrome da caquexia objetivaram exclusivamente, modular mediadores inflamatórios, porém tal abordagem é ineficaz (ROXBURGH; MCMILLAN, 2014). Portanto, fica evidente que outros fatores e mediadores também desempenham um papel proeminente na etiologia da síndrome.

A fim de entender que outros fatores podem estar induzindo à progressão da síndrome, caracterizamos o perfil hormonal e o conteúdo sérico de neuropeptídios em pacientes com câncer e caquexia, bem como investigamos a possível correlação destes fatores com a inflamação sistêmica. Além disso, na tentativa de examinar o *crosstalk* entre o SNC e os tecidos periféricos, conduzimos concomitantemente experimentos em animais, a fim de investigar eventuais alterações de receptores dos sinais periféricos no hipotálamo.

Os resultados mostraram que o conteúdo de hormônios séricos dos pacientes caquéticos difere marcadamente dos pacientes com peso estável. O grupo CC apresentou conteúdo diminuído de amilina, peptídeo inibidor gástrico (GIP), peptídeo semelhante ao glucagon 1 (GLP-1), insulina e leptina, em comparação ao grupo WSC. Não encontramos diferenças na concentração de C-peptídeo, grelina, glucagon, polipeptídio pancreático (PP) e peptídeo YY (PYY), como resultado da caquexia.

O GLP-1 foi postulado como um importante mediador da anorexia, por atuar no núcleo do trato solitário no SNC (HAYES, 2012). Recentemente, em um estudo com modelo animal com ratos portadores de hepatoma, foi demonstrado que o knockdown da expressão de GLP-1 mitiga a perda de apetite e peso associadas à caquexia (BORNER et al., 2018). A insulina é secretada em proporção ao grau de adiposidade (HWANG et al., 2008), o que explica em parte, por que os pacientes CC, que apresentam lipólise aumentada, mostraram um conteúdo mais baixo de insulina circulante (BARACOS, 2000; O'NEILL et al., 2010). Os resultados também podem refletir resistência à insulina ou hipoinsulinemia, todas características da caquexia e descritas em indivíduos com tumores, em decorrência da inflamatória crônica (DEV; BRUERA; DALAL, 2018; FONSECA et al., 2020). Desde outra perspectiva, a insulina circulante é detectada pelo SNC, onde atua como um inibidor de neurônios orexígenos NPY/AgRP (PERRY; WANG, 2012). Em condições normais, um menor conteúdo de insulina quando chega ao hipotálamo e a outras áreas do cérebro irá desencadear um aumento na ingestão de alimentos (WOODS et al., 2006), mas infelizmente, esse mecanismo falha na caquexia cancerosa. A amilina (co-secretada com insulina em resposta à ingestão de nutrientes) é um hormônio de saciedade bem conhecido, que controla o tamanho da refeição, reduz o esvaziamento gástrico e a ingestão de alimentos no SNC (MIETLICKI-BAASE; HAYES, 2014). A leptina modula a ingestão alimentar e seu conteúdo é proporcional à massa gorda. Resultados anteriores de nosso grupo mostram que a expressão de leptina é mais contundentemente reduzida no tecido adiposo subcutâneo (BATISTA et al., 2013). No entanto, a literatura apresenta resultados controversos em relação ao conteúdo de leptina na circulação (relatos de aumentos, diminuições ou, nenhuma mudança), estes podem ser atribuídos às diferenças na contribuição relativa de cada depósito adiposo para a concentração plasmática final, tendo em vista que a emaciação é heterogênea entre os diferentes depósitos (EBADI; MAZURAK, 2015; KARATAS et al., 2017). Além disso, a leptina atua na ativação da população de neurônios anorexígenos POMC/CART e inibe os orexigênicos NPY/AgRP (MOEHLECKE et al., 2016), embora esses efeitos recíprocos da leptina não tenham sido relatados de forma consistente na literatura (TAKAHASHI et al., 2009; BEGENIK et al., 2015). Considerando que a concentração reduzida de leptina deveria induzir aumento no consumo alimentar e reduzir a taxa metabólica basal, esse mecanismo é disfuncional no paciente caquético. Em relação ao papel do GIP, primeiro peptídeo regulador identificado como incretina, este desempenha um papel importante na regulação do pâncreas endócrino, levando à melhora da resposta à insulina e aumento da secreção desse hormônio (GALLWITZ, 2016). Durante a caquexia, concentrações mais baixas podem estar relacionadas à diminuição da ingestão de alimentos e a possíveis períodos de jejum prolongado. Em adição, pode também ter uma correlação com o aumento da resistência à insulina e hipoinsulinemia neste cenário. Embora não tenhamos encontrado estudos na literatura abordando GIP e caquexia cancerosa, Škrha et al. (2017) relataram uma menor concentração plasmática de GIP no câncer pancreático e postularam que essa mudança estava associada à perda de peso (ŠKRHA et al., 2017). Mondello et al. 2014 propuseram a inclusão de grelina e leptina como possíveis marcadores de caquexia (MONDELLO et al., 2014). Vários estudos demonstram conteúdo mais elevado de grelina em pacientes caquéticos, apoiando a ideia de uma possível resistência à grelina, associada à síndrome (KEREM et al., 2008). Em contraste, não foi possível encontrar diferenças no conteúdo sérico da grelina, o que está de acordo com os achados de Huang et al. (HUANG et al., 2007). Como no estudo feito por Huang et al. (2007), os pacientes caquéticos tinham câncer colorretal. Portanto, esses resultados contraditórios podem dever-se às diferenças

impostas pela localização do tumor. Nessa perspectiva, pacientes com câncer colorretal e gástrico poderiam ser candidatos ao uso da grelina como tratamento, devido ao seu potencial orexigênico. (MOLFINO et al., 2014). No entanto, o uso de anamorelina, um mimético da grelina em pacientes com câncer de pulmão, falhou em aumentar a massa e função muscular (ensaios Romana 1 e Romana 2) (TEMEL et al., 2016).

Na tentativa de elucidar os possíveis mecanismos e respostas do SNC concomitantes às alterações hormonais periféricas observadas, também realizamos um estudo em animais. Animais caquéticos portadores de tumor mostraram concentração aumentada de mRNA de NPY hipotalâmico. Outros estudos mostraram que a regulação positiva do NPY está envolvida no aumento da fome em modelos caquéticos, o que pode refletir um esforço para aumentar a ingestão alimentar a nível central (BING et al., 2001; TISDALE, 2002). Em adição, o aumento do NPY desregula diretamente a produção de leptina e insulina, indicando que o efeito do NPY pode causar alterações no perfil hormonal (UETA et al., 2007; LAVIANO et al., 2008b). Além disso, o receptor de leptina (Ob Rb) que integra os sinais de leptina da periferia, apresentou uma concentração de mRNA mais elevada em ratos caquéticos portadores de tumor. Esse resultado pode sugerir que o hipotálamo está orguestrando uma resposta compensatória ao conteúdo reduzido de leptina circulante. Observamos então que parte da informação nutricional que o SNC recebe, pode gerar uma liberação de neuropeptídios orexigênicos, na tentativa de criar um ciclo de feedback para regular a composição corporal e o gasto energético (BRUGGEMAN et al., 2016). Nesse contexto, fomos avaliar o conteúdo circulante de neuropeptídios na nossa coorte humana.

No presente estudo, relatamos que pacientes caquéticos apresentam concentrações mais baixas de peptídeos orexigênicos (MCH e  $\beta$ -endorfina) e anorexigênicos ( $\alpha$ -MSH, neurotensina e oxitocina) na circulação. Enquanto a literatura carece de trabalhos com humanos, os dados em modelo animal concluem que o desequilíbrio de neuropeptídeos pode levar à caquexia (LAVIANO et al., 2002; UETA et al., 2007). Por um lado, concentrações mais baixas de neuropeptídeos orexígenos ( $\beta$ -endorfina e MCH) mostram que o SNC pode falhar em responder à sinalização periférica na caquexia. Estudos em camundongos *knockout* nos quais o gene PMCH

(Pro-MCH) foi inativado levaram à redução do peso corporal devido à hipofagia, uma forte evidência demonstrando que o conteúdo mais baixo de MCH na caquexia pode atuar como neuromodulador, mediando a homeostase energética e a composição corporal (MACNEIL, 2013). Também, de acordo com Zhang et al. (ZHANG et al., 2015) as concentrações mais baixas de β-endorfina na caquexia ativam o hipotálamopituitária-adrenal (HPA), desregulam as funções imunológicas e conduzem à piorado prognóstico no câncer. Por outro lado, a diminuição dos neuropeptídeos anorexigênicos (a-MSH, neurotensina e oxitocina) sugere a tentativa do SNC em neutralizar o desequilíbrio sistêmico a fim de aumentar a ingestão de alimentos na caquexia associada ao câncer. Entretanto, aparentemente essa tentativa falha, tendo em vista que os pacientes caquéticos não apresentam um quadro de anorexia e baixa ingestão alimentar. α-MSH tem propriedades imunomoduladoras, reduzindo a inflamação (SCHAIBLE et al., 2013), seu conteúdo mais baixo no grupo CC pode relacionar-se a uma possível perda de neuroproteção Além disso, a oxitocina é reconhecida como um importante regulador dos estímulos sociais humanos, podendo contribuir para mudanças comportamentais (BURKETT et al., 2016). A diminuição do seu conteúdo em pacientes CC pode estar associada ao jejum, enquanto a anorexia impossibilitaria sua recuperação através da realimentação. (MAEJIMA et al., 2018). O desequilíbrio na secreção de neuropeptídios leva à diminuição do apetite e à perda de peso. Desta forma, as abordagens terapêuticas com fármacos tais como o acetato de megestrol ou cannabinoides,, que têm efeito sobre circuitos neuronais (aumentam as concentrações de leptina e a liberação de neuropeptídio Y, assim como diminuem o conteúdo de citocinas pro-inflamatórias) lograram obter resultados positivos ao estimular o apetite (SADEGHI et al., 2018).

Em adição, para entender as relações existentes entre os todos os fatores circulantes avaliados, foi conduzida vasta análise de correlação. Os resultados mostraram que, enquanto os pacientes WSC mantêm uma relação positiva e linear entre as concentrações circulantes de hormônios e de neuropeptídios, garantindo a homeostase, os pacientes CC perdem a congruência entre produção e a resposta a esses mediadores (BOWMAN-COLIN; SALAZAR; MARTINS, 2016). Em acordo com nossos resultados, vários estudos demonstraram que hormônios como o GLP-1 e neuropeptídios, como o α-MSH, podem apresentar propriedades anti-inflamatórias (ANDERSON; DELGADO, 2008; BOWMAN-COLIN; SALAZAR; MARTINS, 2016).

Sob tal ponto de vista, embora os pacientes com CC mostrem correlação negativa entre GLP-1 e IL-1 $\beta$ , não demonstram correlação positiva entre GLP-1 e a citocina antiinflamatória IL-10 ou  $\alpha$ -MSH e MIP-1 $\alpha$ , que foi detectada em pacientes WSC. Em conjunto, esses resultados indicam que no grupo CC há um comprometimento do *crosstalk* entre o SNC e os sistemas endócrino e imunológico, podendo comprometer os ajustes contraregulatórios às alterações associadas à caquexia.

Após a avaliação das vias periféricas, nosso seguinte objetivo foi caracterizar o Sistema Nervoso Central em pacientes com câncer e caquexia. Nesse contexto, realizamos o primeiro estudo de neuroimagem para caracterizar in vivo a morfologia, funcionalidade e conectividade do cérebro caquético humano. Os resultados obtidos por meio da morfometria baseada no voxel (VBM) mostraram que os pacientes CC apresentam diferenças de volume da substância cinzenta em varias regiões de interesse (ROIs). O grupo CC apresentou um aumento do volume do córtex orbitofrontal direito e esquerdo; do caudado direito e esquerdo; e do putâmen esquerdo, quando comparado ao grupo WSC. Além disso, os volumes da ínsula direita e do giro temporal direito estavam diminuídos nos indivíduos CC. Estas estruturas estão classicamente envolvidas no processamento de informação visceral aferente (interocepção), na interpretação de estímulos gustativos, olfatórios e visuais, no comportamento motivado por recompensa, comportamento relacionado ao estresse, no estado emocional e na ingestão de alimentos (ROLLS, 2004; UDDIN et al., 2017; FLORIO et al., 2018). De fato, grande número das estruturas alteradas formam parte do circuito de recompensa encarregado de responder a estímulos alimentares ao receber os sinais metabólicos de fome ou saciedade (ROLLS, 2015). Os mecanismos que ligam a caquexia com distúrbios no volume cerebral permanecem amplamente desconhecidos. No entanto, estudos realizados em outras doenças, tais como, obesidade, Alzheimer, Parkinson, esquizofrenia, entre outras podem auxiliar o entendimento das alterações cerebrais observadas na caquexia cancerosa. Os estudos de VBM realizados nestas doenças, principalmente nas neurodegenerativas e que se manifestam a longo prazo, mostram volumes diminuídos que caracterizam a atrofia de regiões vinculadas com o quadro clínico do paciente (KAKEDA; KOROGI, 2010; MATSUDA, 2016; GONÇALVES et al., 2017; RADZIUNAS et al., 2018; SCIARA et al., 2020; XU et al., 2020). No entanto, a nível fisiopatológico, a caquexia difere das citadas doenças neurodegenerativas por ser

uma síndrome que podemos considerar como de curto prazo, intensamente progressiva e que leva à morte em um curto período de tempo. Em esse contexto, é importante diferenciar quando à inflamação do SNC aguda ou crônica. A inflamação aguda é causada pela ativação rápida e precoce das células gliais, enquanto a inflamação crónica se instaura quando persiste a inflamação, estando ativa de forma exacerbada as células gliais e ocasiona consecutivamente à degeneração do tecido (SOCHOCKA; DINIZ; LESZEK, 2017). Nossos resultados mostram que na caquexia principalmente encontramos um quadro de inflamação aguda nas estruturas cerebrais, concomitante ou decorrente do quadro de inflamação sistémica associado à síndrome. De fato, em modelo animal foi demostrado que o conteúdo de TNFa e IL-1 no hipotálamo se encontra aumentado decorrente da inflamação sistêmica que caracteriza à caquexia (LIRA et al., 2011; BURFEIND; MICHAELIS; MARKS, 2016). No entanto, também observamos que a ínsula e o giro temporal manifestam redução de volume, o que poderia ser um sinal de atrofia decorrente da caquexia. Na caquexia, observamos padrões nas alterações da substância cinzenta compatíveis por exemplo, com aquelas de pacientes que sofrem lesão cerebral traumática leve (LING; KLIMAJ; MAYER, 2013; WRIGHT et al., 2013). A literatura sugere que nesses pacientes a perda neuronal não ocorre no início do curso de uma doença crônica e demostra não haver evidências nos pacientes de atrofia na fase semi-aguda (LING; KLIMAJ; MAYER, 2013). No entanto, estruturas com volumes aumentados (córtex orbitofrontal, caudado e putâmen) podem chegar a sofrer atrofia induzida por descontrole da inflamação, como demostrado em pacientes com apneia obstrutiva do sono (OSA- do inglês, obstructive sleep apnea) (LIN et al., 2016). Eventos de hipóxia causam um aumento de permeabilidade da barreira hematoencefálica com subsequente formação de edema cerebral (BAILEY et al., 2009). Lin et al. (2016) mostram que há um aumento da substância cinzenta em pacientes com OSA que pode ser causado por edema cerebral vasogênico reversível ou de curto prazo. O estudo mostrou que o tratamento cirúrgico leva à melhora na gravidade da doença e da inflamação sistémica concomitante, com subsequente recuperação das estruturas cerebrais alteradas inicialmente (LIN et al., 2016). Outros estudos em concordância com nossos resultados relataram tanto aumento, quanto diminuição de diferentes regiões frontais associadas ao processamento emocional e regulação cognitiva em pacientes com diabetes Tipo 1, assim como mostraram que na síndrome metabólica a resistência à insulina pode ser uma das causas dessas alterações (LIU et al., 2020; LU et al., 2020). Em conjunto, estas alterações morfológicas decorrentes da síndrome podem ter um papel importante na ingestão alimentar e na qualidade de vida do paciente, tendo em vista que todas as regiões estão envolvidas em funções sensoriais, processamento das informações interoceptivas, no próprio estado emocional e no circuito de recompensa.

Em adição, realizamos análises de correlação entre os dados antropométricos, marcadores inflamatórios circulantes e os volumes das ROI dos pacientes, com o intuito de examinar se as alterações cerebrais observadas são concomitantes e/ou decorrentes da inflamação sistêmica característica da síndrome. Os dados obtidos das análises mostraram que o aumento e a diminuição dos volumes cerebrais estavam positivamente correlacionadas ao peso no grupo CC, indicando que as alterações morfológicas cerebrais podem estar impulsionando a emaciação decorrente da caquexia (LAVIANO et al., 2008a; MOLFINO et al., 2015). Também, nossos dados mostram que os pacientes CC, exclusivamente, apresentaram uma correlação negativa entre o conteúdo de IL-8 e o volume do caudado, indicando que a longo prazo, o aumento crônico de IL-8 pode contribuir à atrofia desta estrutura. Um estudo longitudinal futuro poderia testar a hipótese. Em linha com esta ideia, Gu et al. 2017 mostraram a relação existente entre fatores inflamatórios circulantes e alterações estruturais cerebrais a longo prazo em pacientes idosos sem demência (GU et al., 2017). Também, na doença de Alzheimer foi demostrado em modelo animal que maior conteúdo de IL-8 promove volumes menores de substância cinzenta no hipocampo de macacos, assim como em roedores mostrou-se que a IL8 pode causar danos no tecido cerebral, através de ação neurotóxica ao aumentar a migração transendotelial de neutrófilos, aumentar a liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e aumentar a produção de proteases mediada por neutrófilos (LIU et al., 2010; WILLETTE et al., 2013)

Quando avaliada a substância branca, não observamos nenhuma diferença estatística, ou no volume das ROI, usando a técnica de VBM, tampouco nos valores da anisotropia fracionada (calculados por meio de imagens de tensor de difusão, DTI). No entanto, em doenças de logo prazo e neurodegenerativas como a esclerose múltipla, a literatura mostra amplas alterações que representam lesões extensas dos feixes de fibras da substância branca (HAN et al., 2017). Tendo em vista a

composição da substância cinzenta e branca, acreditamos que a inflamação aguda e a resposta neuroinflamatória decorrentes da síndrome da caquexia atuam e afetam rapidamente os corpos celulares neuronais e as células gliais que constituem a substancia cinzenta (KANDEL; SCHWARTZ; JESSELL, 2013). Não nos foi possível encontrar indícios de que a caquexia afete a substância branca em nenhuma ROI analisada.

Outra técnica implementada no estudo foi a espectroscopia (MRS) focalizada no hipotálamo, por ser esta uma estrutura que atua como centro regulador da homeostasia e tem um papel importante no comportamento alimentar (GROSSBERG; SCARLETT; MARKS, 2010). Dados obtidos por MRS em pacientes obesos demostraram que o IMC elevado se associa à redução de marcadores neuroquímicos de integridade neuronal (como o N-acetilaspartato) em várias regiões do cérebro (KAUR et al., 2017). No entanto, em nossa coorte não encontramos diferenças com o emprego desta técnica. Consideramos que o número de amostras precisa ser incrementado em estudos futuros, tendo em vista que a obtenção de imagens de qualidade de uma pequena região (hipotálamo) foi bem dificultosa, assim como observamos que a qualidade de imagem pode ser afetada pelo tecido circundante e pelo líquido cefalorraquidiano. Em 2020, um estudo de espectroscopia em modelo animal mostrou que os cérebros de camundongos caquéticos apresentam uma depleção significativa de colina, bem como um aumento de glutamina (WINNARD et al., 2020). Tendo em vista que a colina é essencial para a síntese do neurotransmissor acetilcolina, a diminuição de colina no contexto da caquexia poderia ocasionar mudanças na atividade colinérgica que tem um papel fundamental na modulação da inflamação e do apetite (HERMAN et al., 2016).

Para concluir nosso estudo de neuroimagem *in vivo*, avaliamos o efeito da caquexia na conectividade funcional (FC) por meio da técnica de ressonância magnética funcional em repouso (*resting state* fRMI). Os dados revelam que os pacientes CC apresentam 25 conexões negativas e 5 conexões positivas com diferenças estatísticas significativas, em comparação ao grupo WSC. Os resultados sugerem que os pacientes com caquexia apresentaram diferenças funcionais em regiões conhecidas por serem importantes na regulação do peso corporal e no estado emocional (ínsula, putâmen, caudado, núcleo accumbens, giro temporal e temporo-

occipital, entre outras; por favor, refira-se à lista completa fornecida na Tabela 11). Note-se que algumas de estas regiões também apresentavam alterações morfométricas. Em individuais saudáveis que se encontram em jejum noturno, mesmo estado que se encontravam nossos pacientes no momento da aquisição de imagens, Cornier et al. (2009) mostraram que existe uma ativação positiva de diferentes regiões relacionadas à percepção de sinais alimentares e maior motivação para a ingestão de alimento (tais como, ínsula, córtex visual temporal, córtex parietal, ventral estriado, cingulado posterior, hipocampo, córtex sensorial e córtex pré-frontal lateral) (CORNIER et al., 2009, 2013) No entanto, o grupo CC apresentou conectividade reduzida nessas mesmas regiões, sugerindo então que os pacientes caquéticos têm redução do impulso para se alimentarem até no estado pós jejum noturno, o que pode estar associado à anorexia característica da síndrome. Em línha com nossos dados, notificou-se uma redução da eficiência da ínsula, da região temporal e o córtex cingulado em pacientes com anorexia nervosa em estágio inicial (GAUDIO et al., 2015; LAI et al., 2020). Além disso, nos circuitos de recompensa (corpo estriado caudado e putâmen) a resposta à fome ou saciedade não difere no grupo com anorexia nervosa (STEWARD et al., 2017). Em contraposição, indivíduos obesos mostram hiperatividade da ínsula em resposta a estímulos alimentares (MURDAUGH et al., 2012). A ínsula tem importante papel em funções somatossensitivas, sensoriais viscerais e motoras viscerais, assim como é altamente sensível aos sinais periféricos (VANDENBERGH et al., 2005). Em um estudo de fMRI realizado em adultos com deficiência de leptina mostrou-se que a deficiência desse hormônio está associada à maior ativação da ínsula em resposta a estímulos visuais de alimentos (BAICY et al., 2007). Desconhecemos o mecanismo envolvido, porém observamos que o baixo conteúdo de leptina presente nos pacientes caquéticos poderia indicar uma incapacidade de estimulação da ínsula (note-se que é uma região que apresentou alterações morfológicas e funcionais associadas a síndrome).

Como um todo, os resultados obtidos com as técnicas de neuroimagem *in vivo* sugerem que a caquexia pode estar causando as alterações morfológicas e distúrbios na conectividade da substância cinzenta, ou ainda, que a síndrome pode estar sendo impulsionada por estas alterações cerebrais. Os resultados enfatizam a importante interação que existe entre o comportamento alimentar e as regiões com funções

sensoriais (visuais, gustativas), emocionais, interocepção e no circuito de recompensa a estímulos.

Considerando todas as alterações observadas por médio da neuroimagem *in vivo*, foi então possível realizar análises neuropatológicas nas ROI em tecido *post-mortem* facilitado pelo *Oxford Brain Bank* (Inglaterra). Do mesmo jeito que a coorte Brasileira, a coorte utilizada para estas análises não apresentou diferenças nas distribuições de sexo, idade, intervalo *post-mortem* ou estágio tumoral. Os pacientes com câncer e caquexia foram classificados por meio de prontuários clínicos que registravam: perda de peso, anemia, hipoalbuminemia, anorexia, fragilidade física, emagrecimento ou emaciação, de acordo com os critérios de diagnóstico propostos por Evans *et al.* 2008 (EVANS et al., 2008).

Quando avaliada a morfologia neuronal de forma qualitativa em lâminas coradas com H&E, observou-se que os pacientes caquéticos apresentaram neurônios com citoplasma retraído e núcleos escuros, às vezes picnóticos, em comparação com o grupo WSC e Controle. De forma similar a caquexia, observou-se em doenças neurodegenerativas, que processos que se encontram alterados (estresse oxidativo, autofagia ou o aumento de reagentes neurotóxicos no meio) desencadeiam distúrbios na função e na estrutura neuronal, levando à morte dos neurônios (RANSOHOFF, 2016). Além disso, em um quadro de inflamação sistêmica, os sinais periféricos integrados no SNC como a PCR ou citocinas inflamatórias podem induzir as alterações neurais observadas (SUZUKI et al., 2013; EBADI; MAZURAK, 2015). Em adição, os pacientes com caquexia apresentaram uma densidade neuronal aumentada na amigdala e no hipotálamo em relação ao grupo Controle. Em concordância com outros estudos que mostraram aumento da densidade neuronal em outras patologias, como esquizofrenia, autismo ou distúrbios neuropsiguiátricos, as alterações neuronais observadas na caquexia podem ser responsáveis por um processamento deficiente da informação (SELEMON; RAJKOWSKA; GOLDMAN-RAKIC, 1995; RAJKOWSKA; SELEMON; GOLDMAN-RAKIC, 1998; KUBO, 2020).

Adicionalmente, observamos na caquexia diferentes alterações no perfil da neuroglia. Em primeiro lugar, quando se caracterizaram os diferentes fenótipos microgliais observou-se que os pacientes caquéticos apresentaram uma tendência de aumento do marcador microglial Iba1 e nenhuma diferença entre os grupos foi

detectada nas ROI para o marcador CD68. No entanto, quando foi calculada a razão CD68/Iba1, observou-se valores maiores da mesma no núcleo caudado do grupo CC. Isso indica que nessa região, a caquexia leva a um perfil de micróglia com aumento da atividade fagocítica (CD68) em relação à densidade total da micróglia (Iba1). No sistema nervoso central, a micróglia é capaz de orquestrar uma potente resposta inflamatória e suas alterações estão diretamente associadas com a progressão e impulsão de algumas patologias. (RANSOHOFF; EL KHOURY, 2015; SALTER; STEVENS, 2017; BACHILLER et al., 2018; LI; BARRES, 2018). Na caquexia acreditase que a inflamação sistêmica provoca uma hiperativação da micróglia que perpetua a neuroinflamação, uma vez que a micróglia então mostra um perfil mais neurotóxico, com potencial fagocítico e com capacidade de produzir mais mediadores próinflamatórios diferentes daqueles liberados sistemicamente (DISABATO; QUAN; GODBOUT, 2016; NORDEN et al., 2016). Estudos recentes em modelo animal, especificamente em adenocarcinoma pancreático em roedor, mostraram um aumento da micróglia ativa (processos retraídos e um aumento no tamanho do soma) na eminência media e no núcleo arqueado no hipotálamo de animais caquéticos (BURFEIND et al., 2020b). No entanto, Burfeind et al. (2020) também mostraram que a micróglia em equilíbrio pode oferecer um efeito protetor na caquexia, já que sua depleção completa agrava o catabolismo muscular (BURFEIND et al., 2020b).

Além da micróglia, quantificamos os astrócitos, empregando o marcador GFAP. De forma qualitativa, observamos um aumento dessas células na região perivascular dos pacientes caquéticos. Nos resultados quantitativos, os pacientes CC mostraram maior marcação GFAP na região do hipotálamo, caudado e amigdala. O aumento de GFAP é bem descrito em doenças neurodegenerativas, como Alzheimer, nas quais os astrócitos foram postulados como possíveis alvos terapêuticos (PHATNANI; MANIATIS, 2015). Em um modelo animal de câncer pancreático, associou-se a invasão neural à caquexia, tendo-se observado uma relação direta entre a invasão neural e a ativação dos astrócitos na medula espinal. Relatou-se ainda um efeito anti-caquético quando suprimida a ativação astrocítica (IMOTO et al., 2012). O envolvimento dos astrócitos na patologia da caquexia pode estar associado à perda das funções homeostáticas normais e ganho de funções tóxicas por esse tipo celular (MOLOFSKY et al., 2012; LI et al., 2019).

Tendo em vista a neuroinflamação associada à caquexia e as mudanças no perfil da neuroglia observados, examinamos com mais detalhe a via do mTOR, que detém um papel fundamental na resposta imunológica inata e na adaptativa (XIE et al., 2014). A desregulação da sinalização mTOR está relacionada a vários estados patológicos, com resultados particularmente prejudiciais para o desenvolvimento e função do sistema nervoso (HENRY, 2003; SWIECH et al., 2008). Os dados obtidos mostraram que pacientes CC têm alteração de marcadores upstream da via mTOR (TSC1 e TSC2) no putâmen (TSC1 aumentado) e no hipotálamo (TSC2 diminuído). TSC1 e TSC2 formam um complexo e ambas proteínas são necessárias para o funcionamento deste, que atua inibindo mTOR (NELLIST et al., 2001). Na doença de Alzheimer, o grupo do Professor G. DeLuca demostrou que se formam agregados de TSC1 na ausência de TSC2 na região CA1 do hipocampo, levando ao aumento da inflamação, alteração da autofagia, acúmulo de β-amiloides e morte celular via mTOR (ADRIAANSE, 2019) (por favor, referir-se ao APÊNDICE N para ver dados não publicados sobre alteração na autofagia em pacientes com Alzheimer, E. Simoes et al. 2019). No grupo CC observamos que as alterações de TSC1 levam à maior inflamação com o aumento de conteúdo de mTOR e pmTOR no putâmen (houve também um aumento mTOR e pmTOR na amígdala e de pmTOR no tálamo). Nenhum dos grupos apresentou diferenças nos marcadores downstream da via (S6K e pS6K). Com tudo, a via mTOR pode ter um impacto negativo grave no funcionamento do SNC em resposta a marcadores inflamatórios, levando à disfunção sináptica, inibição da neurogênese, priming da microglia, morte neural, declínio cognitivo, perda de memória, alterações comportamentais e danos cerebrais (PALAVRA; AMBROSIO; REIS, 2016) (ilustrado na Figura 29). Frente ao papel crucial da via mTOR no SNC na regulação dos processos anabólicos, controle da ingestão alimentar e plasticidade sináptica, acreditamos que as alterações mostradas são relevantes na fisiopatologia da caquexia cancerosa.



Figura 29. Alterações da via do mTOR na caquexia cancerosa

BHE: Barreira hematoencefálica; TSC1: Hamartina; TSC2: Tuberina; mTOR: via do alvo mecanístico da rapamicina; pmTOR: mTOR fosforilada; S6K: proteína ribossomal S6 quinase e pS6K: S6K fosforilada. (Fonte: Elaborada pela autora)

# Conclusão

#### 7. CONCLUSÃO

A caquexia associada ao câncer modifica o conteúdo sérico de marcadores inflamatórios, hormônios e neuropeptídios nas vias periféricas. Os resultados sugerem que há comprometimento na comunicação entre o SNC e os compartimentos periféricos, associado à síndrome. O SNC de pacientes caquéticos não responde como o observado nos pacientes de peso estável aos sinais circulantes (hormônios e neuropeptídios) que integram sendo que essa alteração independe do estado inflamatório sistêmico.

Os resultados obtidos no estudo de neuroimagem *in vivo*, pioneiro na área, apontam que a caquexia cancerosa está alterando a integridade principalmente da substância cinzenta, sem comprometer a substância branca. Áreas cerebrais diretamente relacionadas com a regulação da homeostasia energética, ingestão alimentar, estado emocional, interceção e perceção sensorial mostraram alterações morfológicas e distúrbios na conectividade na substância cinzenta, na caquexia. Além disso, as análises neuropatológicas em tecido *post-mortem* mostraram nas regiões de interesse uma densidade neuronal anormal, distúrbios da microglia e do perfil dos astrócitos, bem como neuroinflamação dependente da via mTOR nos pacientes caquéticos.

Os resultados obtidos apresentam avanços de grande importância para o entendimento da caquexia, por constituírem o primeiro estudo, ao nosso conhecimento, que descreve o cérebro caquético humano e traz informação sobre as alterações incidentes sobre o SNC de pacientes caquéticos (por favor, refira-se ao sumário gráfico, Figura 30). Neste estudo discutimos como tais distúrbios no SNC podem ser causados pela síndrome ou estar impulsionando a progressão da caquexia. Neste contexto, estudos futuros com ênfase no SNC podem ser de grande relevância para futura proposição de abordagens terapêuticas como alvos na tentativa de uma possível reversão da síndrome.



Figura 30. Alterações do Sistema Nervoso Central associadas a caquexia cancerosa

Cor Laranja: Alterações encontradas nos pacientes com caquexia; D: Direito; E: Esquerdo; C.: Córtex; L.: Lobo; G.: Giro; Post.: Posterior.; Ant.: Anterior; TSC1: Hamartina; TSC2: Tuberina; pmTOR: mTOR fosforilada (FONTE: Elaborada pela autora).

# **Referências Bibliográficas**

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARONSON, N. K. et al. The European organization for research and treatment of cancer QLQ-C30: A quality-of-life instrument for use in international clinical trials in oncology. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 85, n. 5, p. 365–376, 3 mar. 1993.

ADRIAANSE, B. The role of the TSC-complex in selective neuronal vulnerability in Alzheimer's disease. 2019.

ANDERSON, P.; DELGADO, M. Endogenous anti-inflammatory neuropeptides and pro-resolving lipid mediators: a new therapeutic approach for immune disorders. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 12, n. 5B, p. 1830–47, out. 2008.

AOYAGI, T. et al. Cancer cachexia, mechanism and treatment. **World journal of gastrointestinal oncology**, v. 7, n. 4, p. 17–29, 15 abr. 2015.

ARENDS, J. et al. ESPEN guidelines on nutrition in cancer patients. **Clinical Nutrition**, v. 36, n. 1, p. 11–48, 2017.

AREZZO DI TRIFILETTI, A. et al. Comparison of the performance of four different tools in diagnosing disease-associated anorexia and their relationship with nutritional, functional and clinical outcome measures in hospitalized patients. **Clinical Nutrition**, v. 32, n. 4, p. 527–532, 2013.

ARGILÉS, J. M. et al. Molecular mechanisms involved in muscle wasting in cancer and ageing: Cachexia versus sarcopenia. International Journal of Biochemistry and Cell Biology, v. 37, n. 5 SPEC. ISS., p. 1084–1104, 2005.

ARGILÉS, J. M. et al. Cachexia: a problem of energetic inefficiency. **Journal of Cachexia, Sarcopenia** and **Muscle**, v. 5, n. 4, p. 279–286, 2014a.

ARGILÉS, J. M. et al. Cancer cachexia: understanding the molecular basis. **Nature Reviews Cancer**, v. 14, n. 11, p. 754–762, 9 nov. 2014b.

ARGILÉS, J. M. et al. Inter-tissue communication in cancer cachexia. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 15, n. 1, p. 9–20, 2018.

ASHBURNER, J.; FRISTON, K. J. Unified segmentation. **NeuroImage**, v. 26, n. 3, p. 839–851, 1 jul. 2005.

ASHITANI, J. ichi; MATSUMOTO, N.; NAKAZATO, M. Ghrelin and its therapeutic potential for cachectic patients. **Peptides**, v. 30, n. 10, p. 1951–1956, 2009.

AVERY, J. A. et al. Taste quality representation in the human brain. **Journal of Neuroscience**, v. 40, n. 5, p. 1042–1052, 29 jan. 2020.

BACHILLER, S. et al. Microglia in Neurological Diseases: A Road Map to Brain-Disease Dependent-Inflammatory Response. **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 12, p. 488, 2018.

BACHMANN, J. et al. Cachexia worsens prognosis in patients with resectable pancreatic cancer. Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract, v. 12, n. 7, p. 1193–201, jul. 2008.

BAICY, K. et al. Leptin replacement alters brain response to food cues in genetically leptin-deficient adults. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 46, p. 18276–18279, 13 nov. 2007.

BAILEY, D. M. et al. Emerging concepts in acute mountain sickness and high-altitude cerebral edema: From the molecular to the morphological. **Cellular and Molecular Life Sciences.** Springer, v. 66, n. 22, p. 3583-3594, nov. 2009.

BANKHEAD, P. et al. QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 16878, 4 dez. 2017.

BARACOS, V. E. Regulation of skeletal-muscle-protein turnover in cancer-associated cachexia. **Nutrition**, v. 16, n. 10, p. 1015–1018, 2000.

BARACOS, V. E. et al. Cancer-associated cachexia. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, p. 1–18, 2018.

BARACOS, V. E.; MAZURAK, V. C.; BHULLAR, A. S. Cancer cachexia is defined by an ongoing loss

of skeletal muscle mass. Annals of Palliative Medicine, v. 8, n. 1, p. 3–12, 2019.

BATISTA, M. L. et al. Adipose tissue-derived factors as potential biomarkers in cachectic cancer patients. **Cytokine**, v. 61, n. 2, p. 532–539, 2013.

BEGENIK, H. et al. Serum leptin levels in gastric cancer patients and the relationship with insulin resistance. Archives of Medical Science, v. 11, n. 2, p. 346–352, 2015.

BEN-NOUN, L. The Disease That Caused Weight Loss in King David the Great. **Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences.** Gerontological Society of America, v. 59, n. 2, p. 143-145, 2004.

BENNANI-BAITI, N.; WALSH, D. What is cancer anorexia-cachexia syndrome? A historical perspective. Journal of the Royal College of Physicians of Edinburgh, v. 39, n. 3, p. 257–262, 2009.

BIAOXUE, R. et al. Increased serum amyloid A as potential diagnostic marker for lung cancer: a metaanalysis based on nine studies. **BMC Cancer**, v. 16, n. 1, p. 836, 3 dez. 2016.

BING, C. et al. Cachexia in MAC16 adenocarcinoma: Suppression of hunger despite normal regulation of leptin, insulin and hypothalamic neuropeptide Y. **Journal of Neurochemistry**, v. 79, n. 5, p. 1004–1012, 2001.

BLUM, D. et al. Cancer cachexia: A systematic literature review of items and domains associated with involuntary weight loss in cancer. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 80, n. 1, p. 114–144, 2011.

BORNER, T. et al. Brainstem GLP-1 signalling contributes to cancer anorexia-cachexia syndrome in the rat. **Neuropharmacology**, v. 131, p. 282–290, 15 mar. 2018.

BOWMAN-COLIN, C.; SALAZAR, L. A.; MARTINS, J. O. The Role of Endocrine System in the Inflammatory Process. **Mediators of Inflammation**, v. 2016, p. 1–2, 2016.

BOZZETTI, F.; MARIANI, L. Defining and classifying cancer cachexia: A proposal by the SCRINIO Working Group. Journal of Parenteral and Enteral Nutrition, v. 33, n. 4, p. 361–367, jul. 2009.

BRUGGEMAN, A. R. et al. Cancer Cachexia: Beyond Weight Loss. **Journal of Oncology Practice**, v. 12, n. 11, p. 1163–1171, 2016.

BURFEIND, K. G. et al. Circulating myeloid cells invade the central nervous system to mediate cachexia during pancreatic cancer. **eLife**, v. 9, p. 1–27, 1 maio 2020a.

BURFEIND, K. G. et al. Microglia in the hypothalamus respond to tumor-derived factors and are protective against cachexia during pancreatic cancer. **GLIA**, v. 68, n. 7, p. 1479–1494, 1 jul. 2020b.

BURFEIND, K.; MICHAELIS, K. A.; MARKS, D. L. The central role of hypothalamic inflammation in the acute illness response and cachexia. **Seminars in cell & developmental biology**, v. 54, p. 42-52, 2016.

BURKETT, J. P. et al. Oxytocin-dependent consolation behavior in rodents. **Science**, v. 351, n. 6271, p. 375–378, 22 jan. 2016.

CORNIER, M. A. et al. The effects of overfeeding on the neuronal response to visual food cues in thin and reduced-obese individuals. **PLoS ONE**, v. 4, n. 7, 28 jul. 2009.

CORNIER, M. A. et al. Differences in the neuronal response to food in obesity-resistant as compared to obesity-prone individuals. **Physiology and Behavior**, v. 110–111, p. 122–128, 17 fev. 2013.

COSTA, R. G. F. et al. Cancer cachexia induces morphological and inflammatory changes in the intestinal mucosa. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 10, n. 5, p. 1116–1127, 2019.

DE CASTRO, G. S. et al. Human cachexia induces changes in mitochondria, autophagy and apoptosis in the skeletal muscle. **Cancers**, v. 11, n. 9, 2019.

DE MATOS-NETO, E. M. et al. Systemic Inflammation in Cachexia - Is Tumor Cytokine Expression Profile the Culprit? **Frontiers in immunology**, v. 6, p. 629, 2015.

DEANS, C.; WIGMORE, S. J. Systemic inflammation, cachexia and prognosis in patients with cancer. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 8, n. 3, p. 265–269, maio 2005.

DEV, R.; BRUERA, E.; DALAL, S. Insulin resistance and body composition in cancer patients. **Annals of Oncology**, v. 29, n. suppl\_2, p. ii18–ii26, 1 fev. 2018.

DISABATO, D.; QUAN, N.; GODBOUT, J. P. Neuroinflammation: The Devil is in the Details. Journal

of Neurochemistry, v. 139, p. 136-153, 2016.

DOEHNER, W.; ANKER, S. D. Cardiac cachexia in early literature: A review of research prior to Medline. **International Journal of Cardiology**Int J Cardiol, v. 85, n. 1, p. 7-14, 2002.

DOUGLASS, A. M. et al. Central amygdala circuits modulate food consumption through a positive-valence mechanism. **Nature Neuroscience**, v. 20, n. 10, p. 1384–1394, 1 out. 2017.

EBADI, M.; MAZURAK, V. C. Potential Biomarkers of Fat Loss as a Feature of Cancer Cachexia. **Mediators of Inflammation**, v. 2015, p. 1-8, 2015.

EVANS, W. J. et al. Cachexia: a new definition. **Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)**, v. 27, n. 6, p. 793–9, 2008.

FALCONER, J. S. et al. Acute-phase protein response and survival duration of patients with pancreatic cancer. **Cancer**, v. 75, p. 2077–2082, 1995.

FARKAS, J. et al. Cachexia as a major public health problem: frequent, costly, and deadly. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 4, n. 3, p. 173–178, 2013.

FEARON, K. et al. Definition and classification of cancer cachexia: an international consensus. Lancet **Oncology**, v. 12, p. 489–495, 2011.

FEARON, K.; ARENDS, J.; BARACOS, V. Understanding the mechanisms and treatment options in cancer cachexia**. Nature Reviews Clinical Oncology.** Nat Rev Clin Oncol, v. 10, n. 2, p. 90–99, fev. 2013.

FEARON, K. C. et al. Definition of cancer cachexia: effect of weight loss, reduced food intake, and systemic inflammation on functional status and prognosis. **The American journal of clinical nutrition**, v. 83, n. 6, p. 1345–50, jun. 2006.

FEARON, K. C. H. Cancer cachexia: Developing multimodal therapy for a multidimensional problem. **European Journal of Cancer**, v. 44, n. 8, p. 1124–1132, 2008.

FLORIO, T. M. et al. The Basal Ganglia: More than just a switching device. **CNS Neuroscience and Therapeutics.** Blackwell Publishing Ltd, v. 24, n. 8, p. 677–684, 1 ago. 2018.

FONSECA, G. W. P. da et al. Cancer Cachexia and Related Metabolic Dysfunction. International Journal of Molecular Sciences, v. 21, n. 7, p. 2321, 27 mar. 2020.

FRANK, M. G. et al. Microglia serve as a neuroimmune substrate for stress-induced potentiation of CNS pro-inflammatory cytokine responses. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 21, n. 1, p. 47–59, 1 jan. 2007.

FUJISHIMA, S.; AIKAWA, N. Neutrophil-mediated tissue injury and its modulation. **Intensive Care Medicine.** Springer-Verlag, v. 21, n. 3, p. 277–285, mar. 1995.

GALLWITZ, B. Glucagon-like peptide-1 and gastric inhibitory polypeptide: new advances. **Current** opinion in endocrinology, diabetes, and obesity, v. 23, n. 1, p. 23–7, fev. 2016.

GAO, N.; YAN, C.; ZHANG, G. Changes of serum procalcitonin (PCT), C-reactive protein (CRP), interleukin-17 (IL-17), interleukin-6 (IL-6), high mobility group protein-B1 (HMGB1) and D-dimer in patients with severe acute pancreatitis treated with continuous renal replacement therapy (CRRT) and its clinical significance. **Medical Science Monitor**, v. 24, p. 5881–5886, 23 ago. 2018.

GAUDIO, S. et al. Altered resting state functional connectivity of anterior cingulate cortex in drug naïve adolescents at the earliest stages of anorexia nervosa. **Scientific Reports**, v. 5, 4 jun. 2015.

GAVIN, W. et al. Clinical characteristics, outcomes and prognosticators in adult patients hospitalized with COVID-19. American Journal of Infection Control, v. 49, n. 2, p. 158–165, 1 fev. 2021.

GHUMAN, S. et al. Serum inflammatory markers and colorectal cancer risk and survival. **British** Journal of Cancer, n. January, p. 1–8, 2017.

GILL, S. K.; ISHAK, M.; RYLETT, R. J. Exposure of nuclear antigens in formalin-fixed, paraffinembedded necropsy human spinal cord tissue: Detection of NeuN. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 148, n. 1, p. 26–35, 2005.

GONÇALVES, O. F. et al. Alterations of gray and white matter morphology in obsessive compulsive disorder. **Psicothema**, v. 29, n. 1, p. 35–42, 2017.

GROSSBERG, A. J.; SCARLETT, J. M.; MARKS, D. L. Hypothalamic mechanisms in cachexia. **Physiology and Behavior**, v. 100, n. 5, p. 478–489, 2010.

HAN, X. M. et al. Correlation between white matter damage and gray matter lesions in multiple sclerosis patients. **Neural Regeneration Research**, v. 12, n. 5, p. 787–794, 1 maio 2017.

HAYES, M. R. Neuronal and intracellular signaling pathways mediating GLP-1 energy balance and glycemic effects. **Physiology & Behavior**, v. 106, n. 3, p. 413–416, 6 jun. 2012.

HENRY, B. Loss of Tsc1 / Tsc2 activates mTOR and disrupts PI3K-Akt signaling through downregulation of PDGFR. v. 112, n. 8, p. 1223–1233, 2003.

HERMAN, A. M. et al. A cholinergic basal forebrain feeding circuit modulates appetite suppression. **Nature**, v. 538, n. 7624, p. 253–256, 2016.

HOWICK, K. et al. From belly to brain: Targeting the ghrelin receptor in appetite and food intake regulationInternational. **Journal of Molecular Sciences.** MDPI AG. v. 18, n. 2, p. 273, 1 fev. 2017.

HUANG, Q. et al. Circulating Ghrelin in Patients with Gastric or Colorectal Cancer. **Digestive Diseases** and **Sciences**, v. 52, n. 3, p. 803–809, 14 fev. 2007.

HWANG, J. J. et al. Leptin does not directly regulate the pancreatic hormones amylin and pancreatic polypeptide. **Diabetes Care**, v. 31, n. 5, p. 945–951, 2008.

IMOTO, A. et al. Neural invasion induces cachexia via astrocytic activation of neural route in pancreatic cancer. **International Journal of Cancer**, v. 131, n. 12, p. 2795–2807, 15 dez. 2012.

JAIN, S.; GAUTAM, V.; NASEEM, S. Acute-phase proteins: As diagnostic tool. Journal of pharmacy and bioallied sciences, v. 3, n. 1, p. 118–127, 2011.

JENKINS, D. R. et al. The Contribution of Fibrinogen to Inflammation and Neuronal Density in Human Traumatic Brain Injury. **Journal of Neurotrauma**, v. 3, n. 19, p. 2259–2271, 2018.

JOHANSSON, M. W. et al. Plasma P-Selectin Is Inversely Associated with Lung Function and Corticosteroid Responsiveness in Asthma. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 181, n. 11, p. 879–887, 1 nov. 2020.

KAKEDA, S.; KOROGI, Y. The efficacy of a voxel-based morphometry on the analysis of imaging in schizophrenia, temporal lobe epilepsy, and Alzheimer's disease/mild cognitive impairment: a review. **Neuroradiology**, v. 52, n. 8, p. 711–21, 22 ago. 2010.

KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. H.;; JESSELL, T. M. **Principles of neural science**. 5th Edition ed. New York: McGraw-Hill, 2013.

KARATAS, F. et al. The significance of serum leptin level in patients with early stage nonsmall cell lung cancer. **Journal of cancer research and therapeutics**, v. 13, n. 2, p. 204–207, 2017.

KATZ, A. M.; KATZ, P. B. Diseases of the heart in the works of Hippocrates. **British heart journal**, v. 24, n. 3, p. 257–264, maio 1962. D

KAUR, S. et al. Higher visceral fat is associated with lower cerebral N-acetyl-aspartate ratios in middleaged adults. **Metabolic brain disease**, v. 32, n. 3, p. 727–733, 31 jan. 2017.

KEREM, M. et al. Adipokines and ghrelin in gastric cancer cachexia. **World Journal of Gastroenterology**, v. 14, n. 23, p. 3633–3641, 2008.

KIM, J. et al. Basolateral to Central Amygdala Neural Circuits for Appetitive Behaviors. **Neuron**, v. 93, n. 6, p. 1464- 1479.e5, 22 mar. 2017.

KORZHEVSKII, D. E.; KIRIK, O. V. Brain Microglia and Microglial Markers. **Neuroscience and Behavioral Physiology**, v. 46, n. 3, p. 284–290, 2016.

KREIS, R. Issues of spectral quality in clinical 1H-magnetic resonance spectroscopy and a gallery of artifacts. **NMR in biomedicine**, v. 17, n. 6, p. 361–81, out. 2004.

KUBO, K. Increased densities of white matter neurons as a cross-disease feature of neuropsychiatric disorders. **Psychiatry and Clinical Neurosciences**, v. 74, n. 3, p. 166–175, 8 mar. 2020.

LAI, J. et al. Fractional amplitude of low frequency fluctuation in drug-naïve first-episode patients with anorexia nervosa: A resting-state fMRI study. **Medicine (United States)**, v. 99, n. 9, 2020.

LAPLANTE, M. et al. mTOR signaling in growth control and disease. **Cell**, v. 149, n. 2, p. 274–93, 13 abr. 2012.

LAURENCE, J. Z. The diagnosis of surgical cancer. London: Churchill, 1858.

LAVIANO, A. et al. Neurochemical mechanisms for cancer anorexia. **Nutrition**, v. 18, n. 1, p. 100–105, 2002.

LAVIANO, A. et al. Neural control of the anorexia-cachexia syndrome. American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism, v. 295, n. 5, p. 1000–1008, 2008a.

LAVIANO, A. et al. NPY and brain monoamines in the pathogenesis of cancer anorexia. **Nutrition**, v. 24, n. 9, p. 802–805, 2008b.

LAVIANO, A. et al. Neuroinflammation: A Contributing Factor to the Pathogenesis of Cancer Cachexia. **Critical Reviews in Oncogenesis**, v. 17, n. 3, p. 247–252, 2012.

LAVIANO, A.; MUSCARITOLI, M.; FANELLI, F. R. Lipid Mobilising Factor in Cancer Cachexi. In: **Cachexia and Wasting: A Modern Approach**. [s.l.] Springer Milan, 2007. p. 489–493.

LEPPANEN, J. et al. Basal ganglia volume and shape in anorexia nervosa. **Appetite**, v. 144, 1 jan. 2020.

LI, K. et al. Reactive Astrocytes in Neurodegenerative Diseases. **Aging and disease**, v. 10, n. 3, p. 664–675, jun. 2019.

LI, Q.; BARRES, B. A. Microglia and macrophages in brain homeostasis and disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 18, n. 4, p. 225–242, 20 abr. 2018.

LIMA, J. D. C. C. et al. Tumour-derived transforming growth factor-β signalling contributes to fibrosis in patients with cancer cachexia. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 55, n. April, 2019.

LIN, D. et al. Functional identification of an aggression locus in the mouse hypothalamus. **Nature**, v. 470, n. 7333, p. 221–6, 10 fev. 2011.

LIN, W. C. et al. Longitudinal brain structural alterations and systemic inflammation in obstructive sleep apnea before and after surgical treatment. **Journal of Translational Medicine**, v. 14, n. 1, p. 1–11, 2016.

LING, J. M.; KLIMAJ, S.; MAYER, A. R. A prospective study of gray matter abnormalities in mild traumatic brain injury. p. 2121–2127, 2013.

LIRA, F. S. et al. Hypothalamic inflammation is reversed by endurance training in anorectic-cachectic rats. **Nutrition and Metabolism**, v. 8, n. 1, 2011.

LIRA, F. S. et al. The therapeutic potential of exercise to treat cachexia. Current Opinion in Supportive and Palliative Care, v. 9, n. 4, p. 317–324, dez. 2015.

LIU, J. et al. Altered Gray Matter Volume in Patients With Type 1 Diabetes Mellitus. **Frontiers in Endocrinology**, v. 11, p. 45, 13 fev. 2020.

LIU, Y. J. et al. Peripheral T cells derived from Alzheimer's disease patients overexpress CXCR2 contributing to its transendothelial migration, which is microglial TNF- $\alpha$ -dependent. **Neurobiology of Aging**, v. 31, n. 2, p. 175–188, fev. 2010.

LU, R. et al. Insulin resistance accounts for metabolic syndrome-related alterations in brain structure. **Alzheimer's & Dementia**, v. 16, n. S10, p. 1–11, 2020.

LUTZ, T. A. Control of energy homeostasis by amylin. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 69, n. 12, p. 1947–1965, 2012.

MACNEIL, D. J. The role of melanin-concentrating hormone and its receptors in energy homeostasis. **Frontiers in Endocrinology**, v. 4, n. APR, p. 1–14, 2013.

MAEJIMA, Y. et al. The Anorexigenic Neural Pathways of Oxytocin and Their Clinical Implication. **Neuroendocrinology**, v. 107, n. 1, p. 91–104, 2018.

MASIAS, C.; CATALAND, S. R. The role of ADAMTS13 testing in the diagnosis and management of thrombotic microangiopathies and thrombosis. **Blood.** American Society of Hematology, v. 132, n. 9, p. 903–910, 30 ago. 2018.

MATSUDA, H. MRI morphometry in Alzheimer's disease. **Ageing research reviews**, v. 30, p. 17–24, 2016.

MAURIAC, C. Essai sur les maladies du coeur-de la mort subite: dans l'insuffisance des valvules sigmoides de l'aorte. L. Leclerc. ParisL. Leclerc, 1860.

MCSORLEY, S. T. et al. The relationship between tumour stage, systemic inflammation, body composition and survival in patients with colorectal cancer. **Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)**, v. 37, n. 4, p. 1279–1285, 1 ago. 2018.

MIETLICKI-BAASE, E. G.; HAYES, M. R. Amylin activates distributed CNS nuclei to control energy balance. **Physiology and Behavior**, v. 136, p. 39–46, 2014.

MOEHLECKE, M. et al. Determinants of body weight regulation in humans. Archives of Endocrinology and Metabolism, v. 60, n. 2, p. 152–162, 2016.

MOLFINO, A. et al. Ghrelin: From discovery to cancer cachexia therapy. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 17, n. 5, p. 471–476, 2014.

MOLFINO, A. et al. Contribution of Neuroinflammation to the Pathogenesis of Cancer Cachexia. **Mediators of Inflammation.** Hindawi Limited, p. 1-7, 2015.

MOLOFSKY, A. V et al. Astrocytes and disease: a neurodevelopmental perspective. **Genes & development**, v. 26, n. 9, p. 891–907, 1 maio 2012.

MONDELLO, P. et al. Emerging markers of cachexia predict survival in cancer patients. **BMC Cancer**, v. 14, n. 1, p. 1–10, 2014.

MORAN, T. H. Gut peptides in the control of food intake. **International Journal of Obesity**, v. 33, n. S1, p. S7–S10, 2009.

MORTON, G. J. et al. Central nervous system control of food intake and body weight. **Nature**, v. 443, n. 7109, p. 289–95, 21 set. 2006.

MURDAUGH, D. L. et al. FMRI reactivity to high-calorie food pictures predicts short- and long-term outcome in a weight-loss program. **NeuroImage**, v. 59, n. 3, p. 2709–2721, 1 fev. 2012.

MUSCARITOLI, M. et al. Prevalence of malnutrition in patients at first medical oncology visit: The PreMiO study. **Oncotarget**, v. 8, n. 45, p. 79884–79896, 2017.

NELLIST, M. et al. TSC2 missense mutations inhibit tuberin phosphorylation and prevent formation of the tuberin-hamartin complex. **Human Molecular Genetics**, v. 10, n. 25, p. 2889–2898, 2001.

NEVES, R. X. et al. White adipose tissue cells and the progression of cachexia: inflammatory pathways. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 7, n. 2, p. 193–203, maio 2016.

NI, J.; ZHANG, L. Cancer Cachexia: Definition, Staging, and Emerging Treatments. Cancer management and research, v. 12, p. 5597–5605, 2020.

NIETO-CASTANON, A. Handbook of functional connectivity Magnetic Resonance Imaging methods in CONN. 2020.

NORDEN, D. M. et al. Sequential activation of microglia and astrocyte cytokine expression precedes increased iba-1 or GFAP immunoreactivity following systemic immune challenge. **Glia**, v. 64, n. 2, p. 300–316, fev. 2016.

O'NEILL, E. D. et al. Absence of insulin signalling in skeletal muscle is associated with reduced muscle mass and function: evidence for decreased protein synthesis and not increased degradation. **AGE**, v. 32, n. 2, p. 209–222, 12 jun. 2010.

OKEN, M. M. et al. Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. **American journal of clinical oncology**, v. 5, n. 6, p. 649–55, dez. 1982.

OSLER, W. The principles and practice of medicine. D. Appleton and Company, 1901.

PALAVRA, F.; AMBROSIO, A. F.; REIS, F. mTOR and Neuroinflammation. **Molecules to Medicine** with mTOR: Translating Critical Pathways into Novel Therapeutic Strategies, p. 57–68, 2016.

PATRA, S. K.; ARORA, S. Integrative role of neuropeptides and cytokines in cancer anorexia-cachexia syndrome. **Clinica Chimica Acta**, v. 413, n. 13–14, p. 1025–1034, 2012.

PERRY, B.; WANG, Y. Appetite regulation and weight control: the role of gut hormones. **Nutrition & diabetes**, v. 2, n. 1, p. e26, 2012.

PETRUZZELLI, M. et al. A switch from white to brown fat increases energy expenditure in cancerassociated cachexia. **Cell Metabolism**, v. 20, n. 3, p. 433–447, 2014.

PETRUZZELLI, M.; WAGNER, E. F. Mechanisms of metabolic dysfunction in cancer-associated cachexia. **Genes & Development**, v. 30, n. 5, p. 489–501, 1 mar. 2016.

PHATNANI, H.; MANIATIS, T. Astrocytes in neurodegenerative disease. **Cold Spring Harbor** perspectives in biology, v. 7, n. 6, p. a020628, 15 abr. 2015.

PITTMAN, J. G.; COHEN, P. The Pathogenesis of Cardiac Cachexia. New England Journal of Medicine, v. 271, n. 8, p. 403–409, 20 ago. 1964.

PORPORATO, P. E. Understanding cachexia as a cancer metabolism syndrome. **Oncogenesis**, v. 5, n. 2, p. e200, 2016.

PROCTOR, M. J. et al. An inflammation-based prognostic score (mGPS) predicts cancer survival independent of tumour site: A Glasgow Inflammation Outcome Study. **British Journal of Cancer**, v. 104, n. 4, p. 726–734, 15 fev. 2011.

PROVENCHER, S. W. Automatic quantitation of localized in vivo 1H spectra with LCModel. **NMR in biomedicine**, v. 14, n. 4, p. 260–4, jun. 2001.

RADZIUNAS, A. et al. Brain MRI morphometric analysis in Parkinson's disease patients with sleep disturbances. **BMC neurology**, v. 18, n. 1, p. 88, 20 jun. 2018.

RAJKOWSKA, G.; SELEMON, L. D.; GOLDMAN-RAKIC, P. S. Neuronal and Glial Somal Size in the Prefrontal Cortex. Archives of General Psychiatry, v. 55, n. 3, p. 215, 1 mar. 1998.

RANSOHOFF, R. M. How neuroinflammation contributes to neurodegeneration. **Science.** American Association for the Advancement of Science, v. 353, n. 6301, p. 777-783, 19 ago. 2016.

RANSOHOFF, R. M.; EL KHOURY, J. Microglia in Health and Disease. Cold Spring Harbor perspectives in biology, v. 8, n. 1, p. a020560, 9 set. 2015.

REANO, S.; GRAZIANI, A.; FILIGHEDDU, N. Acylated and unacylated ghrelin administration to blunt muscle wasting. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 17, n. 3, p. 236–240, maio 2014.

REDDEL, C. J. et al. Increased thrombin generation in a mouse model of cancer cachexia is partially interleukin-6 dependent. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 15, n. 3, p. 477–486, 1 mar. 2017.

REID, J. et al. Non-steroidal anti-inflammatory drugs for the treatment of cancer cachexia: A systematic review. **Palliative Medicine**, v. 27, n. 4, p. 295–303, 26 abr. 2013.

ROELAND, E. J. et al. Management of cancer cachexia: ASCO guideline. Journal of Clinical Oncology, v. 38, n. 21, p. 2438–2453, 1 jul. 2020.

ROLLS, E. T. The functions of the orbitofrontal cortex. **Brain and Cognition**, v. 55, n. 1, p. 11–29, 2004.

ROLLS, E. T. Taste, olfactory, and food reward value processing in the brain. **Progress in Neurobiology.** Elsevier Ltd, v. 127-128, p. 64-90, 1 abr. 2015.

ROXBURGH, C. S. D.; MCMILLAN, D. C. Cancer and systemic inflammation: treat the tumour and treat the host. **British journal of cancer**, v. 110, n. 6, p. 1409–12, 2014.

SADEGHI, M. et al. Cancer cachexia: Diagnosis, assessment, and treatment. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 127, n. April, p. 91–104, 2018.

SALTER, M. W.; STEVENS, B. Microglia emerge as central players in brain disease. **Nature Medicine**, v. 23, n. 9, p. 1018–1027, 1 set. 2017.

SCHAIBLE, E.-V. et al. Single Administration of Tripeptide  $\alpha$ -MSH(11–13) Attenuates Brain Damage by Reduced Inflammation and Apoptosis after Experimental Traumatic Brain Injury in Mice. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, p. e71056, 5 ago. 2013.

SCIARA, A. N. et al. Neuroinflammatory Gene Expression Alterations in Anterior Cingulate Cortical White and Gray Matter of Males With Autism Spectrum Disorder. **Autism research : official journal of the International Society for Autism Research**, v. 13, n. 6, p. 870–884, 2020.

SEELAENDER, M. et al. Inflammation in Cachexia. Mediators of Inflammation, v. 2015, 2015.

SELEMON, L. D.; RAJKOWSKA, G.; GOLDMAN-RAKIC, P. S. Abnormally High Neuronal Density in the Schizophrenic Cortex. Archives of General Psychiatry, v. 52, n. 10, p. 805, 1 out. 1995.

ŠKRHA, J. et al. Lower plasma levels of glucose-dependent insulinotropic peptide (GIP) and pancreatic polypeptide (PP) in patients with ductal adenocarcinoma of the pancreas and their relation to the presence of impaired glucoregulation and weight loss. **Pancreatology**, v. 17, n. 1, p. 89–94, jan. 2017.

SOCHOCKA, M.; DINIZ, B. S.; LESZEK, J. Inflammatory Response in the CNS: Friend or Foe? **Molecular Neurobiology**, v. 54, n. 10, p. 8071–8089, 2017.

STANLEY, S. et al. Hormonal regulation of food intake. **Physiological reviews**, v. 85, n. 4, p. 1131–58, out. 2005.

STEWARD, T. et al. Neural Network Alterations Across Eating Disorders: A Narrative Review of fMRI Studies. **Current Neuropharmacology**, v. 16, n. 8, p. 1150–1163, 19 out. 2017.

STRAUB, R. H. et al. Energy regulation and neuroendocrine-immune control in chronic inflammatory diseases. **Journal of Internal Medicine**, v. 267, n. 6, p. 543–560, 2010.

SUZUKI, H. et al. Cancer cachexia—pathophysiology and management. Journal of Gastroenterology, v. 48, n. 5, p. 574–594, 2013.

SUZUKI, S. et al. Non-GI-Malignancy-Related Malabsorption Leads to Malnutrition and Weight Loss. In: **Cachexia and Wasting: A Modern Approach**. Springer Milan. p. 509–519, 2007.

SWAAB, D. F. et al. The Human Hypothalamus in Health and Disease, Proceedings of the 17th International Summer School of Brain Research, held at the Auditorium of the University of Amsterdam. **Progress in Brain Research.** Elsevier, v. 93, p. 333–341, 1992.

SWIECH, L. et al. Role of mTOR in physiology and pathology of the nervous system. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1784, n. 1, p. 116–132, 2008.

TAKAHASHI, M. et al. Ghrelin and leptin levels in cachectic patients with cancer of the digestive organs. **International Journal of Clinical Oncology**, v. 14, n. 4, p. 315–320, 25 ago. 2009.

TAYLOR, H. C. Cancer: Its Study and Prevention. Philadelphia: Lea & Febiger, 1901.

TEMEL, J. S. et al. Anamorelin in patients with non-small-cell lung cancer and cachexia (ROMANA 1 and ROMANA 2): results from two randomised, double-blind, phase 3 trials. **The Lancet Oncology**, v. 17, n. 4, p. 519–531, abr. 2016.

TEUNISSEN, S. C. C. M. et al. Symptom Prevalence in Patients with Incurable Cancer: A Systematic Review. Journal of Pain and Symptom Management, v. 34, n. 1, p. 94–104, 2007.

TISDALE, M. J. Cachexia in cancer patients. Nature Reviews Genetics, v. 3, n. 11, p. 883–889, 2002.

TISDALE, M. J. Proteolysis-Inducing Factor in Cancer Cachexia. **Cachexia and Wasting: A Modern Approach**. Springer Milan, p. 483–488, 2007.

TISDALE, M. J. Are tumoral factors responsible for host tissue wasting in cancer cachexia? **Future oncology (London, England)**, v. 6, n. 4, p. 503–13, abr. 2010.

TOLEDO, M. et al. Cancer cachexia: physical activity and muscle force in tumour-bearing rats. **Oncology reports**, v. 25, n. 1, p. 189–93, 2011.

UDDIN, L. Q. et al. Structure and Function of the Human Insula. **Journal of Clinical Neurophysiology.** Lippincott Williams and Wilkins, v. 34, n. 3, p. 300–306, 1 jul. 2017.

UETA, Y. et al. Hypothalamic Neuropeptides and Appetite Response in Anorexia-Cachexia Animal. **Endocrine Journal**, v. 54, n. 6, p. 831–838, 2007.

VANDENBERGH, J. et al. Regional brain activation during proximal stomach distention in humans: A positron emission tomography study. **Gastroenterology**, v. 128, n. 3, p. 564–573, 2005.

VON HAEHLING, S.; ANKER, S. D. Prevalence, incidence and clinical impact of cachexia: facts and numbers—update 2014. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle.** Wiley Online Library, v. 5, n. 4, p. 261–263, 26 nov. 2014.

WANG, M. et al. Differences of inflammatory and non-inflammatory indicators in Coronavirus disease-19 (COVID-19) with different severity. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 85, 1 nov. 2020.

WARREN, S. The immediate cause of death in cancer. **The American Journal of the Medical Sciences**, v. 184, n. 5, 1932.

WATCHORN, T. M. et al. Proteolysis-inducing factor regulates hepatic gene expression via the transcription factors NF-(kappa)B and STAT3. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 15, n. 3, p. 562–4, 1 mar. 2001.

WILLETTE, A. A. et al. Interleukin-8 and interleukin-10, brain volume and microstructure, and the influence of calorie restriction in old rhesus macaques. **Age**, v. 35, n. 6, p. 2215–2227, dez. 2013.

WINNARD, P. T. et al. Brain metabolites in cholinergic and glutamatergic pathways are altered by pancreatic cancer cachexia. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 11, n. 6, p. 1487–1500, 2020.

WOODS, S. C. et al. Pancreatic signals controlling food intake; insulin, glucagon and amylin. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 361, n. 1471, p. 1219–1235, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Cancer fact sheet**. Disponível em: <a href="https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cancer">https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cancer</a>>. Acesso em: 2 abr. 2021.

WRIGHT, M. J. et al. Early metabolic crisis-related brain atrophy and cognition in traumatic brain injury. **Brain Imaging and Behavior**, v. 7, n. 3, p. 307–315, set. 2013.

WYART, E. et al. Cachexia, a systemic disease beyond muscle atrophy. International Journal of Molecular Sciences. MDPI AG, v. 21, n. 22, p. 1–18, 2 nov. 2020.

XIE, L. et al. mTOR signaling inhibition modulates macrophages/microglia-mediated neuroinflammation and secondary injury via regulatory T cells after focal ischemia. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 192, n. 12, p. 6009–6019, 15 jun. 2014.

XU, X. et al. Grey matter abnormalities in Parkinson's disease: a voxel-wise meta-analysis. **European** journal of neurology, v. 27, n. 4, p. 653–659, 2020.

ZHANG, C. et al. Beta-endorphin cell therapy for cancer prevention. **Cancer prevention research** (Philadelphia, Pa.), v. 8, n. 1, p. 56–67, jan. 2015.

ZHANG, Y. et al. Acute phase reactant serum amyloid A in inflammation and other diseases. In: Advances in Clinical Chemistry. \Academic Press Inc. v.90, p. 25–80, 2019.

# Apêndices

## 9. APÊNDICES

## 9.1. APÊNDICE A – Escalas para quantificação semi-quantitativa da via do mTOR









Amígdala



Hipocampo



Tálamo



Hipotalamo



## •Escalas mTOR

#### Caudado



#### Putâmen



#### Amígdala



#### Hipocampo



#### Tálamo



### Hipotálamo





•Escalas pmTOR

#### Caudado



#### Putâmen

n - //			e de			10		1. 1. 1. 1. 1. 1. 1. 1. 1. 1. 1. 1. 1. 1	
1. 1. 1. C.	0 F.	A	9 . 2		9	10 0 1			
	10			. # 9.	4		6 17	(a) 🛔	St. 3.
the second second				-		in the second	1.00		1.10.19
. v.		. 1 . the	14		20		001	the second	0.
	6.0							10	-

#### Amígdala



#### Hipocampo



## Tálamo



#### Hipotálamo











 9.2. APÊNDICE B – Correlações entre medidas antropométricas e parâmetros bioquímicos em WSC e CC

Análise de correlação não paramétrica de Spearman entre variáveis biológicas. Cada gráfico de dispersão no painel corresponde ao par de variáveis indicadas nas etiquetas dos eixos horizontal e vertical. O valor do coeficiente de Spearman (p) é indicado pela cor de acordo com a escala de cor à direita, e os valores de p significativos encontram-se destacados em vermelho.



9.3. APÊNDICE C – Correlações entre citocinas em pacientes WSC e CC

Análise de correlação não paramétrica de Spearman entre variáveis biológicas. Cada gráfico de dispersão no painel corresponde ao par de variáveis indicadas nas etiquetas dos eixos horizontal e vertical. O valor do coeficiente de Spearman (p) é indicado pela cor de acordo com a escala de cor à direita, e os valores de p significativos encontram-se destacados em vermelho.


9.4. APÊNDICE D - Correlações entre hormônios em pacientes WSC e CC

Análise de correlação não paramétrica de Spearman entre variáveis biológicas. Cada gráfico de dispersão no painel corresponde ao par de variáveis indicadas nas etiquetas dos eixos horizontal e vertical. O valor do coeficiente de Spearman (p) é indicado pela cor de acordo com a escala de cor à direita, e os valores de p significativos encontram-se destacados em vermelho.



9.5. APÊNDICE E - Correlações entre neuropeptídios em pacientes WSC e CC

Análise de correlação não paramétrica de Spearman entre variáveis biológicas. Cada gráfico de dispersão no painel corresponde ao par de variáveis indicadas nas etiquetas dos eixos horizontal e vertical. O valor do coeficiente de Spearman (p) é indicado pela cor de acordo com a escala de cor à direita, e os valores de p significativos encontram-se destacados em vermelho.

9.6. APÊNDICE F – Correlações de medidas antropométricas, parâmetros bioquímicos e marcadores circulantes em pacientes WSC e CC



(A) Correlações entre medidas antropométricas e o conteúdo de citocinas

(B) Correlações entre medidas antropométricas e o conteúdo de hormônios wsc cc





(C) Correlações entre medidas antropométricas e o conteúdo de neuropeptídios

Análise de correlação não paramétrica de Spearman entre variáveis biológicas. Cada gráfico de dispersão no painel corresponde ao par de variáveis indicadas nas etiquetas dos eixos horizontal e vertical. O valor do coeficiente de Spearman (p) é indicado pela cor de acordo com a escala de cor à direita, e os valores de p significativos encontram-se destacados em vermelho.



### 9.7. APÊNDICE G – Análise global da substância cinzenta em pacientes WSC e CC

O painel da esquerda representa as regiões aumentadas nos pacientes CC em comparaçao ou WSC, enquanto á direita encontran-

se as regiões diminudas no grupo CC. Considerado p-valor significatico quando pFWE<0,05



### 9.8. APÊNDICE H – Análise global da substância branca em pacientes WSC e CC

O painel da esquerda representa as regiões aumentadas nos pacientes CC em comparaçao ou WSC, enquanto á direita encontranse as regiões diminudas no grupo CC. Considerado p-valor significatico quando pFWE<0,05.



#### 9.9. APÊNDICE I – Imagem por tensores de difusão (DTI) - Diferenças nos valores da anisotropia fracionada

Não houve diferenças considerado p-valor significatico quando pFWE<0,05.

## 9.10. APÊNDICE J – Relatórios clínicos originais da coorte procedente do Oxford brain bank

	Case		age	sex	pmi (hrs)	Cancer diagnosis	Clinical records	Neuropathology diagnosis
	2008/17	1	84	f	48	Control	Hypertension. Controlled Diabetes	Cerebrovascular disease with CERAD Normal, Braak I/II
	2001/83	2	79	f	29	Control		Normal aged brain - no evidence of cognitive impairment
	2013/96	3	92	f	48	Control		Normal aged brain - no evidence of cognitive impairment
	2006/116	4	89	f	24	Control	Hypertension.	Cerebrovascular disease with CERAD Normal, Braak I/II
TROL	2017/55	5	81	m	114	Control	Control	Normal aged brain - no evidence of cognitive impairment
CON	2017/109	6	77	f	81	Control	Hypertension. Controlled Diabetes	Normal aged brain - no evidence of cognitive impairment
	2008/97	7	92	m	120	Control		Cerebrovascular disease with CERAD Normal, Braak I/II
	2006/53	8	71	m	38	Control		Normal aged brain, Braak I/II
	2017/24	9	74	m	43	Control	Ruptured abdominal aortic aneurysm	Normal aged brain, Braak II - no evidence of cognitive impairment
	2012/38	10	88	f	96	Control		Cerebrovascular disease with CERAD Normal, Braak I
	2002/48	11	89	m	72	Metastatic prostate carcinoma. Dissemination: spinal cord	No weight loss. Radiotherapy. Hypertension. Non-diabetic.	Normal aged brain - no evidence of cognitive impairment
	2004/43	12	85	f	23	Stomach carcinoma	No weight loss. Radiotherapy. Hypertension. Non-diabetic.	Normal aged brain - no evidence of cognitive impairment
sc	121/2012	15	89	f	24	Breast cancer	Eating well. Losing weight. No anaemic (Hb 12.4g/dL). Normal C-reactive protein. Normal albumin (3.6g/dL).	Normal aged brain, Braak II - no evidence of cognitive impairment
×	B3724	16	70	m	31	Metastatic caecal adenocarcinoma. Dissemination: spinal cord	No weight loss reported.	
	B5799	17	75	m	32	Metastatic bladder adenocarcinoma. Dissemination: pancreas	No weight loss reported.	
	B6906	18	88	f	84	Metastatic stomach adenocarcinoma. Dissemination: bone	No weight loss reported. Hypercalcemia. Hiatus hernia. Osteoarthritis of lumbar spine. Pulmonary embolism.	
	1234/94	19	82	m	30	Metastatic caecal carcinoma. Dissemination: widespread metastases	Terminal illness and decline. Non-diabetic.	Normal aged brain, Braak I/II
	2006/146	20	77	f	48	Metastatic gastrointestinal carcinoma. Dissemination:	Weight loss 12.7kg. Anaemic (Hb 9.6g/dL).Hypoalbuminemia (2.8 g/dL). Anorexia. Obstruction. Non-diabetic.	Normal aged brain, Braak I/II
	136/2012	21	77	f	24	Large bowel/liver carcinoma	Anemia (Hb 10g/dL). Albumin (3.4g/dL). Anorexia. Nausea. Diarrhoea.	Normal aged brain, Braak I
	145/2013	22	92	m	72	Larynx cancer progressed to lung cancer	Physically much frailer	Normal aged brain - no evidence of cognitive impairment
	2005/107	13	79	f	96	Metastatic gastrointestinal carcinoma. Dissemination: bones	Anaemia. Non-diabetic. Pain. Frailty	Normal aged brain, Braak I/II
8	54/2010	14	92	m	24	Metastatic adenocarcinoma, unknown primary	Sudden terminal illness and decline	
	B4763	23	87	m	48	Metastatic caecal adenocarcinoma. Dissemination: peritoneal mets.	Depression. Anorexia. Emaciated	
	B6878	24	75	f	72	Pelvic adenocarcinoma with omental secondary.	Wasted	
	B8123	25	86	m	10	Metastatic pancreatic adenocarcinoma. Dissemination: lymph nodes, omentum, adrenal gland, liver and lung	Extremely emaciated	•••
	B8497	26	95	f	67	Metastatic pelvic adenocarcinoma (probably uterine primary). Dissemination: pelvic lymph nodes and lungs.	Emaciated	Normal aged brain - no evidence of cognitive impairment

PMI: Intervalo *post-mortem*. CERAD: Consórcio para Estabelecer um Registro da Doença de Alzheimer; Braak: Estágio de emaranhados neurofibrilares.



9.11. APÊNDICE K – Marcação Iba1 nas ROI específicas

Imagens de microscopia óptica com aumento de 400x. WSC: Câncer sem caquexia; CC: Câncer com caquexia; CA3: região CA3 do hipocampo; CA1: região CA1 do hipocampo.



9.12. APÊNDICE L - Marcação CD68 nas ROI específicas

Imagens de microscopia óptica com aumento de 400x.WSC: Câncer sem caquexia; CC: Câncer com caquexia; CA3: região CA3 do hipocampo; CA1: região CA1 do hipocampo.



## 9.13. APÊNDICE M – Marcação GFAP nas ROI específicas

Imagens de microscopia óptica com aumento de 400x. WSC: Câncer sem caquexia; CC: Câncer com caquexia. CONTROLE n= 8-10; WSC n= 5-6; CC n= 8-10.

9.14. APÊNDICE N – Estudo realizado na doença de Alzheimer durante o estágio no exterior (BEPE)

Title ALTERED ENDOSOMAL-LYSOSOMAL MATURATION DRIVEN ALZHEIMER'S DISEASE

Author and affiliations: E. Simoes<sup>1</sup>, B.A. Adriaanse<sup>2</sup>, D.J. Beard<sup>3</sup>, M.M. Esiri<sup>2</sup>, G.C. DeLuca<sup>2</sup>

1. Cancer Metabolism Research Group, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

2. Academic Unit of Neuropathology, Nuffield Department of Clinical Neurosciences, University of Oxford, Oxford, UK.

3. Radcliffe Department of Medicine, University of Oxford, Oxford, UK

**Purpose** Selective neuronal vulnerability (SNV) in the hippocampus is a hallmark feature of Alzheimer's disease (AD) pathology. In AD, the Cornus-Ammonis (CA)-1 subfield is particularly vulnerable to AD pathology compared to the CA3 subfield. However, the underlying mechanism of SNV in the AD hippocampus remains elusive. Abnormalities in the autophagolysosomal system have been implicated in the pathogenesis of neuronal loss in AD. In this study, our aim was to determine whether autophagosome (AP) and autolysosome (AL) formation play a role in SNV in the AD hippocampus,

**Methods** Human post-mortem tissue of AD cases (n=8) and non-neurologic controls (n=5) was used. CA1 and CA3 hippocampal subfields were immunolabelled for prelysosomal (LAMP1, early endosomal (EEA1, Rab5) and late endosomal (LAMP2 and Rab7) markers. Semi-quantitative expression of each marker in polymorphic, pyramidal and molecular layers of the CA3 and CA1 hippocampal subfields was undertaken for comparisons between hippocampal subfields and disease groups.

**Results** Neuronal LAMP1 (p=0.008) and Rab5 (p=0.0079) was increased in CA3 in AD compared to control. In contrast, LAMP2 (p=0.0497) and Rab5 (p=0.0476) was elevated in CA1 neurons in AD compared to control. In AD cases, neuronal expression of LAMP1 (p=0.0078), EEA1 (p=0.0078) and Rab7 (p=0.0312) was reduced in CA1 compared to CA3.

**Conclusion** Hippocampal subfields in AD demonstrate different expression patterns of endo-lysosomal markers with CA1 neurons having increased early endosome-lysosomal markers and reduced late endo-lysosomal markers compared to CA3. These results suggest that dysfunction of these subcellular compartments may contribute to disruption of autophagy in select neuronal populations making them susceptibility to neurodegeneration.

## Anexos

10.1. ANEXO A - Termo de consentimento livre e esclarecido

### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

### ESTUDO: Inflamação sistêmica em pacientes caquéticos com câncer: mecanismos e estratégias terapêuticas, uma abordagem da medicina translacional.

O sr(a) está sendo convidado (a) a participar do Projeto de Pesquisa acima citado. O documento abaixo contém todas as informações necessárias sobre a pesquisa que estamos fazendo. Sua participação neste estudo será de muita importância para nós. Caso o sr(a) não queira participar ou desistir a qualquer momento, isso não causará nenhum prejuízo ao seu tratamento, ou seja, sua participação é espontânea.

#### Estou ciente que:

O estudo é de importância para que possamos investigar as possíveis causas e mecanismos (o que está acontecendo no seu corpo) da caquexia (que causa fraqueza, cansaço, perda de peso, de músculo, de apetite e de qualidade de vida), uma possível consequência de muitas doenças crônicas. Nosso objetivo é encontrar as causas dessa doença e possíveis tratamentos.

Caso aceite participar da pesquisa, antes da sua internação no hospital, faremos algumas perguntas sobre a sua saúde e poderemos pedir para colher suas fezes (no horário em que você escolher evacuar), saliva e/ou urina. Durante a sua cirurgia, o cirurgião poderá retirar pequenos fragmentos (cerca de 1g, o equivalente ao tamanho de dois grãos de feijão) da gordura da sua barriga ou do seu pescoço (logo abaixo da pele) e de dentro dela (gordura que fica próxima aos órgãos), além de um pedaço um pouco menor (do tamanho aproximado de um grão de feijão) do músculo da sua barriga ou do seu pescoço a depender da localização do seu tumor, que será cortado durante a sua cirurgia (músculo reto abdominal, ou músculo pré-tireoidiano, ou músculo esternocleidomastoideo, ou músculo milo hioideo). Para os pacientes controle, casos de hérnia abdominal ou inguinal, será coletado apenas o tecido adiposo subcutâneo e muscular. Se na sua cirurgia for necessária a retirada de uma pequena porção de fígado (para a análise microscópica), será retirado também um fragmento pequeno (cerca de 0,2g ou dois grãos de arroz) para o estudo. Se a cirurgia envolver a retirada de uma porção de intestino, parte do material que seria descartado poderá ser utilizado para a pesquisa. Se possível, será retirado um fragmento do seu tecido doente na presença do médico patologista, sem prejuízos para a andamento do seu tratamento. Todos esses procedimentos podem aumentar o tempo de cirurgia em não mais que 5 minutos. Não será necessário prolongar a anestesia, por que os procedimentos realizados para a coleta são os mesmos da cirurgia. A coleta de amostras para esse estudo não modifica, de forma alguma, os procedimentos padrão da cirurgia a qual você será submetido. Todo esse material servirá para entender melhor a doença chamada caquexia e, se você participar do estudo com exercício físico, o material também servirá para entender se o exercício melhora os sintomas da doença.

Mesmo que você concorde com a doação de todas as amostras, o cirurgião e a equipe médica poderão coletar apenas algumas delas ou mesmo, nenhuma, conforme a condução da cirurgia, para que não haja aumento de riscos ou qualquer prejuízo para você.

De acordo com os resultados dos exames laboratoriais e clínicos prévios à cirurgia e após consentimento do médico, você poderá ser convidado a participar do Protocolo de Exercício Físico, que terá duração de seis semanas. Tais exames, como eletrocardiograma, hemograma e dosagens bioquímicas diversas não terão custos adicionais, pois, são exames já solicitados na rotina ambulatorial (CLÁUSULA IX). Se você concordar em participar no estudo que envolve exercício físico, pediremos para realizar coletas de 20 mL de sangue venoso do braço (quantidade mostrada na seringa que o pesquisador está mostrando a você nesse momento), na primeira, terceira e sexta semana de treinamento, para que os parâmetros plasmáticos e séricos (substâncias no seu sangue) possam ser medidos (isso permite avaliar como você está reagindo ao exercício). A coleta será realizada por um profissional da saúde devidamente habilitado e ocorrerá durante a sessão de exercício, realizada no próprio hospital. Para aqueles que não participam do protocolo de exercício e com a cirurgia marcada para seis semanas após o contato com o pesquisador, serão realizadas três coletas de sangue (20ml) nas primeira, terceira e sexta semanas de acompanhamento. Para os pacientes em que a cirurgia está marcada para menos de seis semanas após o contato com o pesquisador, será realizada uma coleta de sangue (20 ml) previamente à cirurgia, sem interferir no procedimento cirúrgico, por um profissional da saúde devidamente habilitado, também no hospital, em condições de assepsia, ou seja, higiene total. O seu sangue será analisado para verificarmos o grau de inflamação, que é uma medida utilizada pela equipe de saúde para entender as mudanças que ocorrem em seu organismo devido à doença e à associação desta inflamação com o que você sente. Se você também participar da pesquisa com exercício físico, avaliaremos se o protocolo causa melhora dos sintomas. A coleta de sangue pode causar algum desconforto e algumas vezes, aparecimento de hematoma (mancha roxa).

Para participantes no protocolo de exercício: Antes da realização do exercício, um médico do hospital deverá avaliar sua condição física (através de verificação de seus batimentos do coração ao caminhar), para garantir sua segurança na realização do protocolo. Esse teste poderá ser repetido no fim do protocolo de exercício, para avaliar seu grau de adaptação ao treinamento (o quanto o treinamento melhorou sua condição cardiorrespiratória – funcionamento do seu coração e do seu pulmão). Esses testes não causam dor e não têm risco associado (teste submáximo).

Para participantes no protocolo de exercício: O protocolo de exercício será realizado 5 dias por semana, por até 6 semanas, nas dependências do hospital, na presença de profissionais de saúde. Você realizará a atividade física dentro de seus próprios limites de conforto e segurança, ou seja, o exercício é individual, conforme as condições de cada participante da pesquisa. Não há nenhuma meta de desempenho a ser atingida e você fará apenas o tempo de exercício que considerar confortável. O protocolo consiste em caminhar numa esteira (como as de academias de ginástica), sempre com a presença de um profissional de saúde ao seu lado. Os desconfortos que podem ocorrer são aqueles de uma caminhada normal: calor, cansaço e produção de suor. Você pode desistir a qualquer momento, sem precisar fornecer qualquer explicação.

Para participação do protocolo: o exercício será realizado na academia da Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo (EEFE-USP) com duração de 6 semanas, frequência de duas vezes semanais e intervalo de descanso de, no mínimo, 48 horas entre as sessões. O treinamento será composto por exercícios para membros superiores (braços), tronco e membros inferiores (pernas). Haverá progressão de intensidade de acordo com a capacidade

física do paciente. Serão três fases de treinamento: Adaptação, Transição e Fase final. Os exercícios são:

- a) Supino máquina: Adução horizontal da articulação glenoumeral (fechar os braços) combinada com extensão de cotovelos a partir da posição sentada na máquina com o banco ajustado para a altura do executante de modo que os pés estejam totalmente apoiados no chão e as mãos estejam no apoio da máquina, na altura do peitoral;
- b) Remada aberta máquina: Abdução horizontal e extensão da articulação glenoumeral a partir da posição sentada com os pés apoiados no chão;
- c) Agachamento Smith: Flexão e extensão das articulações de joelhos, quadris e tornozelos: os pés devem estar afastados à largura dos ombros com a barra apoiada sobre os ombros e não sobre o pescoço.
- d) Stiff: Flexão de quadril com os joelhos semi estendidos e a coluna em posição neutra, os pés devem estar afastados à largura dos ombros e a barra deve ser segurada com as mãos em pronação (palmas das mãos viradas para dentro) ou em pegada mista com uma mão em pronação e a outra em supinação (palma da mão virada para fora).

( ) Aceito ( ) Não aceito

Na avaliação biomecânica serão analisados parâmetros eletromiográficos (de ativação do músculo), dinâmicos e cinemáticos (filmagem) dos movimentos de sua capacidade física de marcha e de sentar e levantar e também o equilíbrio postural do paciente.

- a) Avaliação dos movimentos cotidianos: sentar e levantar: Você será instruído (a) a levantar e sentar em uma cadeira sem apoio para os braços. No início do teste o voluntário deverá estar sentado com as costas sem apoio e os pés em contato com o solo, um em cada plataforma de força, o espaçamento dos pés será livre. Você deverá levantar permanecer em pé de modo estável por 1s e em seguida sentar-se, retornando à posição inicial. Serão realizadas cinco repetições do teste.
- b) Avaliação da locomoção: você será instruído a caminharem em velocidade auto selecionada passando por 2 plataformas de força, com cada pé fazendo contato com uma das plataformas. Os voluntários deverão utilizar o espaço de 8m disponível para a execução do teste, permitindo assim que a velocidade média possa ser monitorada com o auxílio de um cronômetro. Serão realizadas 5 tentativas válidas.

( ) Aceito ( ) Não aceito

Você pode ser convidado a realizar outros exames pelo seu médico, dentro da conduta clínica regular, cujo resultado também poderá ser usado na pesquisa:

- a) No exame de sua composição corporal, o pesquisador avaliará o quanto você tem de músculo, gordura e osso no corpo e como a doença, ou o exercício físico, modificam esse parâmetro; nesse exame, você permanece deitado numa cama e não terá contato com o aparelho, que também não oferece qualquer risco à sua saúde.
- b) No exame de ressonância magnética cerebral, o pesquisador avaliará a morfologia (aspecto anatômico), funcionalidade (atividade) e constituição dos componentes do seu cérebro ou como o exercício físico modifica esses parâmetros (ou seja, se o seu cérebro mostra alguma alteração em consequência da doença e se o exercício caso você esteja também fazendo esse protocolo- altera o que é afetado pela doença); Nesse exame você deverá colocar a cabeça dentro de um aparelho que emite som e por isso, pode causar algum desconforto pelo ruído, ou pela posição em que você se colocará. Esse exame não é perigoso e não causa qualquer mal à sua saúde.

No exame de tomografia computadorizada, o médico avaliará o tamanho da lesão, invasão e comprometimento de estruturas adjacentes (se apenas um ou mais órgãos estão afetados pela doença) e se há gordura dentro do seu músculo. O exame não causa desconfortos e não é necessário o uso de contraste ou modificação de protocolo médico em função da participação na pesquisa. Esse exame não causa dor ou prejuízo à sua saúde.

c) Para entender se os exercícios podem melhorar sua sensação de dor faremos uma avaliação com um equipamento chamado de QST que vai avaliar suas respostas após estimulo térmico (quente/frio) e mecânico (leve pressão).

As coletas realizadas de tecidos, tumor, sangue, fezes e os exames de composição corporal servirão para o entendimento e estudo da doença e poderão ajudar na busca de tratamentos. A **participação neste projeto não tem como objetivo, contudo, tratar sua doença**, mas sim dar uma contribuição para que possamos definir as alterações que ocorrem no corpo devido a doença.

Você não terá qualquer despesa financeira com relação aos procedimentos médicos, clínicos e terapêuticos efetuados no estudo.

Você não receberá compensação financeira por participação do estudo, pois os procedimentos do estudo serão realizados nas visitas que você já deverá fazer ao hospital, dentro da indicação médica. Se participar da pesquisa com exercício, será oferecido vale transporte para todos os dias que vier fazer a atividade no hospital. Caso queira você receberá um pequeno lanche após o treino.

Você tem a liberdade de desistir ou de interromper a colaboração neste estudo no momento em que desejar, sem necessidade de qualquer explicação;

A desistência não causará nenhum prejuízo à sua saúde ou bem-estar físico. Não virá a interferir no atendimento ou tratamento médico, ou nos agendamentos necessários.

Os resultados obtidos durante este estudo serão mantidos em sigilo, mas você deve concordar que sejam divulgados em publicações científicas (resumos de congressos, livros e artigos de periódicos científicos), desde que seus dados pessoais não sejam mencionados. Isso é importante para garantir que a pesquisa possa ser conhecida e possivelmente melhorar o diagnóstico, o atendimento e o tratamento de pacientes com a mesma doença que a sua.

Você aceita que seus tecidos e fezes sejam utilizados em estudos posteriores envolvendo os temas caquexia, inflamação, câncer e exercício, afim de, compreender os mecanismos envolvidos no surgimento e na avaliação dos efeitos do treinamento físico (quando houver) na síndrome caquexia associada ao câncer:

- ( ) Aceito
- ( ) Não aceito

O material coletado poderá ser armazenado em soluções específicas para cada técnica, em freezer -80°, para manter a integridade das amostras e posterior utilização, sempre dentro da mesma linha de pesquisa.

Caso você desejar, poderá, pessoalmente, tomar conhecimento dos resultados ao final desta pesquisa;

- () Desejo conhecer os resultados desta pesquisa.
- ( ) Não desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

Esse é um Projeto Temático, financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (processo n. 12/50079-0), que será desenvolvido no Instituto de Ciências Biomédicas - ICB/USP/São Paulo. numa colaboração que envolve os seguintes pesquisadores: Giorgio Trinchieri e Romina Goldzmid (National Institute of Health - NIH); Josép Argilés e Silvia Busquets (University of Barcelona); Alessandro Laviano e Maurizio Muscaritoli (Universíty La Sapienza UniRoma); Gerhard Püschel e Tiziana Magaria (University of Potsdam); Stephen Farmer (Boston University); Marília Cerqueira Leite Seelaender, Alison Colquhoun e José Cezar Rosa Neto (ICB/ USP); Paulo Sérgio Alcântara, Linda Maximiniano, Oscar Fujita, Claudio Campi e Emerson Muller (HU/ USP); José Pinhata Otoch e Geraldo Busatto Filho (FMUSP); Emerson Franchini (EEFE/ USP); Renata Wassermann (IME/ USP); Claudia Oller do Nascimento e Lila Missaie Oyama (UNIFESP); e Miguel Batista Junior (UMC – Universidade de Mogi das Cruzes) e Dr. Marcos Fortes (HRBA – Hospital Regional do Baixo Amazonas).

A qualquer momento, você poderá entrar em contato com a Comitê de Ética em Experimentos com seres Humanos do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, ou o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário ou com o Comitê de Ética da Santa Casa de São Paulo, ou o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Câncer Dr. Arnaldo, que são os órgãos que avaliam a realização de pesquisas com pessoas e garantem que a pesquisa da qual você participa seja de importância clínica e/ou científica e que está sendo conduzida de forma apropriada. O telefone, email e endereço dessas comissões estão no fim desse documento, que será emitido em 2 vias, para que você tenha uma cópia.

Caso você tenha, em algum momento, desconforto relacionado à sua doença (a participação na pesquisa só poderá causar desconforto adicional mínimo, relacionado à coleta de sangue adicional), você deverá entrar em contato, através do telefone fornecido ao final desse documento (Pronto-atendimento do Instituto de Câncer Dr. Arnaldo, pronto-atendimento do HU, ou ambulatório da Coloproctologia da Santa Casa).

Eu, (inserir o nome, profissão, residente e domiciliado na, telefone)

abaixo assinado (a), concordo de livre e espontânea vontade em participar como voluntário (a) do estudo "Inflamação sistêmica em participante da pesquisas caquéticos com câncer: mecanismos e estratégias terapêuticas, uma abordagem da medicina translacional".

"CONCORDO, APÓS CONVENIENTEMENTE ESCLARECIDO PELO PESQUISADOR E TER ENTENDIDO O QUE ME FOI EXPLICADO, EM PARTICIPAR DA PRESENTE PESQUISA".

	Sao Paulo-SP,	de	 de 20
() Participante da pesquisa			
Testemunha 1:			
	Nome / RG / Tele	fone	

Testemunha 2:

Nome / RG / Telefone

# 10.2. ANEXO B – Ferramenta de Excel® (Office 2021) utilizada para diagnostico da caquexia

	NT'S INFORMATI	ON
Identification	Gender	Age (Years)
562A	Female	39
Height (m)	Prev. weight (kg)	Current weight (kg)
1.69	68.6	63.5
SECOND CR	iteria - Weight S	TRENGTH
Method	Score	Result
Questionnaire (QLC-C30)	73.33333333	
Answer 1	2	
Answer 2	2	OUT
Answer 3	2	001
Answer 4	2	
Answer 5	1	
FOURT	I CRITERIA - ANO	REXIA
Method	Score	
		Result
Questionnaire (QLC-C30)	100.00	Result
Questionnaire (QLC-C30) Answer 13	100.00 1	Result OUT
Questionnaire (QLC-C30) Answer 13	100.00 1	Result OUT
Questionnaire (QLC-C30) Answer 13 SIXTH CRITERIA	100.00 1 - BIOCHEMICAL P	OUT
Questionnaire (QLC-C30) Answer 13 SIXTH CRITERIA Parameters	100.00 1 - BIOCHEMICAL P Concentration	Result OUT PARAMETERS Result
Questionnaire (QLC-C30) Answer 13 SIXTH CRITERIA Parameters C-Reactive protein (mg/l)	100.00 1 - BIOCHEMICAL P Concentration 14.51	Result OUT PARAMETERS Result
Questionnaire (QLC-C30) Answer 13 SIXTH CRITERIA Parameters C-Reactive protein (mg/I) IL-6 (pg/ml)	100.00 1 - BIOCHEMICAL P Concentration 14.51	Result OUT PARAMETERS Result
Questionnaire (QLC-C30) Answer 13 SIXTH CRITERIA Parameters C-Reactive protein (mg/l) IL-6 (pg/ml) Anemia - Hb (g/dl)	100.00 1 - BIOCHEMICAL P Concentration 14.51 	Result OUT PARAMETERS Result IN
Questionnaire (QLC-C30) Answer 13 SIXTH CRITERIA Parameters C-Reactive protein (mg/l) IL-6 (pg/ml) Anemia - Hb (g/dl) Albumin (g/dl)	100.00 1 - BIOCHEMICAL P Concentration 14.51 10.20 4.40	Result OUT PARAMETERS Result IN