

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS (BIOQUÍMICA)**

CAIO VINICIUS TELES ROSSINI

**Avaliação da eficácia do *Bj*-PRO-10c na
prevenção e tratamento da caquexia induzida por
câncer de pâncreas**

Versão Corrigida da Tese Defendida

São Paulo

Data de Depósito na SPG:

01/06/2023

CAIO VINICIUS TELES ROSSINI

**Avaliação da eficácia do *Bj*-PRO-10c na
prevenção e tratamento da caquexia induzida por
câncer de pâncreas**

Tese apresentada ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo
para obtenção do Título de Doutor em
Ciências (Bioquímica)

Orientadora: Profa. Dra. Claudiana Lameu

São Paulo

2023

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

R835a Rossini, Caio Vinicius Teles
Avaliação da eficácia do Bj-PRO-10c na prevenção e tratamento da caquexia induzida por câncer de pâncreas / Caio Vinicius Teles Rossini. - São Paulo, 2023.
193 p.

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Bioquímica.
Orientador: Lameu, Claudiana

1. Caquexia. 2. Câncer de pâncreas. 3. Peptídeo Potenciador de Bradicinina 10c. 4. Xenotransplante. 5. Modelo animal. I. T. II. Lameu, Claudiana, orientador.



Universidade de São Paulo
Instituto de Química

"Avaliação da eficácia do Bj-PRO-10c na prevenção e tratamento da caquexia induzida por câncer de pâncreas"

CAIO VINICIUS TELES ROSSINI

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências obtido no Programa Ciências Biológicas (Bioquímica) - Área de Concentração: Bioquímica.

Profa. Dra. Claudiana Lameu Gomes
(Orientadora e Presidente)

APROVADO(A) POR:

Prof. Dr. Fábio Luís Forti
IQ - USP

Prof. Dr. Hamilton Augusto Roschel da Silva
EEFE - USP

Prof. Dr. Eduardo Rochete Ropelle (por videoconferência)
FCA - UNICAMP

SÃO PAULO
14 de agosto de 2023

Dedico este trabalho a minha família, que embora eu não expresse em palavras, vocês são diretamente responsáveis por esta conquista.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha orientadora Prof. Dr. Claudiana Lameu, por todo ensino, conselho e apoio que me proporcionou desde nosso primeiro contato, tal orientação que me permitiu amadurecer de forma profissional e pessoal. Sou muito grato por todo o empenho, dedicação, tempo prestado e auxílio que a senhora me disponibilizou nos últimos anos.

Agradeço à CAPES, CNPq e FAPESP (Processo nº 2019 / 08999-3) pelo investimento financeiro durante o desenvolvimento do trabalho.

Agradeço a todos os grandes mestres do Instituto de Química que conheci em todo o doutoramento, por toda a dedicação em ensinar e compartilhar o seu conhecimento.

Agradeço aos meus colegas de laboratório pelas conversas, conselhos, apoio e ensinamentos, onde posso afirmar que com certeza serão futuros excelentes profissionais.

Agradeço a minha companheira Mariana Morelli, um amor que demorou 10 anos para amadurecer e que hoje se tornou tão sólido quanto uma rocha. Por todos os momentos de felicidade, tristeza, medo, superação e confiança, sou grato.

Agradeço ao Prof. Dr. Luiz Juliano Neto (UNIFESP) pela síntese do peptídeo.

Agradeço ao Prof. Dr. Eduardo Moraes Rego Reis e Dr. Luís Bruno da Cruz e Alves de Moraes por fornecerem os fragmentos de tumor e discussões que enriqueceram este trabalho.

Agradeço aos médicos Prof. Dr. Jose Jukemura e Prof. Dr. Marcel Cerqueira Cesar Machado por fornecerem os fragmentos de tumor e os dados dos pacientes doadores.

Agradeço a Prof. Dr. Marília Cerqueira Leite Seelaender por todo auxílio na construção e desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço aos pacientes que colocaram suas vidas à disposição da ciência e por doarem fragmentos de seus tumores para a execução deste trabalho. Embora

não os tenha conhecido, sempre lembrarei de vocês com carinho e admiração pela coragem que tiveram ao enfrentar esse difícil desafio. Obrigado por confiarem em nós. Onde quer que estejam, sou eternamente grato.

Por fim, a todos aqueles que de alguma forma estiveram e estão próximos a mim. Prometo reconhecer essa proximidade, ajuda e incentivo todos os dias da minha vida.

“Per ardua ad astra”.

Royal Air Force

RESUMO

Rossini, C.V.T. **Avaliação da eficácia do Bj-PRO-10c na prevenção e tratamento da caquexia induzida por câncer de pâncreas**. 2023. 188 p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

O adenocarcinoma ductal pancreático (PDA) é uma neoplasia letal frequentemente associada à caquexia, uma síndrome caracterizada pela perda de peso excessiva, desgaste muscular, redução do tecido adiposo e comprometimento físico, resultando em desnutrição, anorexia e diminuição da qualidade de vida e sobrevivência. A caquexia do câncer é dividida em três estágios de relevância clínica: pré-caquexia ("leve"), caquexia e caquexia refratária ("grave"); onde a progressão depende de fatores como inflamação sistêmica, tipo e estágio do tumor, ingestão de alimentos e resposta ao tratamento. Atualmente, não há métodos de prevenção disponíveis para a caquexia e o tratamento em pacientes caquéticos é paliativo e multimodal, ou seja, não existe uma terapia padrão estabelecida. Tendo em vista esse cenário, o presente estudo buscou estabelecer dois modelos de caquexia utilizando fragmentos de tumores PDA de dois pacientes (P08 e P12) e avaliar o efeito da administração crônica do peptídeo Bj-PRO-10c, que atua em duas vias de sinalização relacionadas à caquexia. Curiosamente, o transplante de PDA proveniente do paciente 12 causou uma caquexia "leve", enquanto o do paciente 08 resultou em uma forma mais grave da síndrome, alinhando-se aos achados clínicos dos doadores. O Bj-PRO-10c exibiu efeitos protetores contra a perda de peso, atrofia muscular, redução do tecido adiposo e estresse oxidativo associados à caquexia induzida pelo PDA. O peptídeo reduziu a produção de ânion superóxido em células tumorais pancreáticas, preservou o peso corporal em estágios avançados da doença e atenuou a degradação muscular e adiposa, sem afetar o crescimento tumoral. Esses resultados destacam a importância de pesquisas adicionais para desenvolver terapias eficazes que visem as vias de sinalização da caquexia, melhorando a sobrevida e a qualidade de vida dos pacientes com PDA.

Palavras-chave: Caquexia; Câncer de pâncreas; Peptídeo Potenciador de Bradicinina 10c; Xenotransplante; Modelo Animal

ABSTRACT

Rossini, C.V.T. **Evaluation of the effectiveness of Bj-PRO-10c in the prevention and treatment of pancreatic cancer-induced cachexia.** 2023. 188 p. PhD Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDA) is a lethal neoplasm often associated with cachexia, a syndrome characterized by excessive weight loss, muscle wasting, reduced adipose tissue and physical impairment, resulting in malnutrition, anorexia and decreased quality of life and survival. Cancer cachexia is divided into three clinically relevant stages: pre-cachexia ("mild"), cachexia, and refractory cachexia ("severe"); where progression depends on factors such as systemic inflammation, tumor type and stage, food intake, and response to treatment. Currently, there are no prevention methods available for cachexia and treatment in cachectic patients is palliative and multimodal, that is, there is no established standard therapy. In view of this scenario, the present study sought to establish two models of cachexia using fragments of PDA tumors from two patients (P08 and P12) and to evaluate the effect of chronic administration of the peptide Bj-PRO-10c, which acts on two signaling pathways related to cachexia. Interestingly, the PDA transplant from patient 12 caused "mild" cachexia, while that from patient 08 resulted in a more severe form of the syndrome, in line with the clinical findings of the donors. Bj-PRO-10c exhibited protective effects against weight loss, muscle atrophy, adipose tissue reduction, and oxidative stress associated with PDA-induced cachexia. The peptide reduced superoxide anion production in pancreatic tumor cells, preserved body weight in advanced stages of the disease, and attenuated muscle and adipose degradation, without affecting tumor growth. These results highlight the importance of further research to develop effective therapies that target cachexia signaling pathways, improving survival and quality of life for patients with PDA.

Keywords: Cachexia; Pancreatic cancer; Bradykinin-Potentiating Peptide 10c; Xenograft; Animal model

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ang I: Angiotensina I

Ang II: Angiotensina II

ASS: Argininosuccinato sintase

Bj-PRO-10c / BPP-10c: Peptídeo Potenciador de Bradicininina 10c

C26: Linhagem celular de adenocarcinoma do cólon de camundongo

C2C12: Linhagem celular de mioblastos de camundongo

ECA: Enzima conversora de angiotensina

H₂O₂: Peróxido de hidrogênio

IL-1 β: Interleucina 1 β

IL-1: Interleucina 1

IL-10: Interleucina 10

IL-6: Interleucina 6

LLC: Carcinoma pulmonar de Lewis

MAFbx / Atrogin-1: Muscle atrophy F-box

MuRF1: Muscle RING-Finger 1

NF-κB: Nuclear fator kappa B

NK: Células natural *killer*

NO: Óxido nítrico

NO₂⁻: Nitrito

NO₃⁻: Nitrato

NOS: Óxido nítrico sintase

O₂^{·-}: Superóxido

PDA: Adenocarcinoma Ductal Pancreático

PDX08 - NT: Camundongos transplantados com PDA humano derivado do paciente 08 e que não receberam tratamento com Bj-PRO-10c

PDX08 - T: Camundongos transplantados com PDA humano derivado do paciente 08 e que receberam tratamento com Bj-PRO-10c

PDX12 - NT: Camundongos transplantados com PDA humano derivado do paciente 12 e que não receberam tratamento com Bj-PRO-10c

PDX12 - T: Camundongos transplantados com PDA humano derivado do paciente 12 e que receberam tratamento com Bj-PRO-10c

RNS: Espécies reativas de nitrogênio

ROS: Espécies reativas de oxigênio

SOD: Enzima superóxido dismutase

TNF- α : Fator de necrose tumoral alpha

TS: Tempo de suspensão

UCP1: Proteína desacopladora 1

UPS: Sistema ubiquitina-proteassoma

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Anatomia do pâncreas.

Figura 2: Caquexia do câncer por local do tumor.

Figura 3: Espectro caquético associado ao câncer.

Figura 4: Visão esquemática da via UPS.

Figura 5: Esquema de funcionamento do sistema renina-angiotensina.

Figura 6: Representação esquemática dos múltiplos mecanismos envolvidos no desenvolvimento da caquexia.

Figura 7: Principais adaptações metabólicas associadas à carga tumoral.

Figura 8: Envolvimento da ativação de UCP-1 na caquexia do câncer

Figura 9: Comparação de modelos de xenoenxertos atuais.

Figura 10: Procedimento geral para a geração do modelo de xenoenxerto derivado de paciente (PDX).

Figura 11: Representação esquemática do ciclo citrulina-NO.

Figura 12: Representação esquemática de proteção associada ao fenótipo oxidativo contra a perda de massa muscular.

Figura 13: Representação esquemática do potencial terapêutico do Bj-PRO-10c como modulador da caquexia.

Figura 14: Representação esquemática do planejamento experimental in vivo.

Figura 15: Avaliação da viabilidade celular de mioblastos não diferenciados após o tratamento com Bj-PRO-10c.

Figura 16: Produção de superóxido em células precursoras de mioblastos expostas ao Bj-PRO-10c.

Figura 17: Heterogeneidade clínica em camundongos transplantados com PDA oriundos de pacientes diferentes.

Figura 18: Efeito sistêmico dos tumores xenográficos na variação do peso corporal.

Figura 19: Comparação de animais transplantados com PDX08 em relação ao controle no momento da eutanásia.

Figura 20: Comparação de animais transplantados com PDX12 em relação ao controle no momento da eutanásia.

Figura 21: Efeito sistêmico dos tumores xenográficos na variação do peso corporal progressivo livre de tumor.

Figura 22: Variação do peso corporal final livre de tumor.

Figura 23: Comprimento de tibia dos camundongos no momento da eutanásia.

Figura 24: A perda de peso não está associada a diminuição da ingestão de alimentos em animais xenoenxertados com PDA.

Figura 25: Desempenho locomotor progressivo de camundongos controle e transplantados com PDA na arena de campo aberto durante o teste de 5 min.

Figura 26: Efeitos de xenotumores PDA em comportamentos ansiolíticos.

Figura 27: Teste de suspensão de quatro membros em tela invertida

Figura 28: Avaliação do tempo de suspensão em relação ao desenvolvimento da caquexia.

Figura 29: Os xenoenxertos PDA induzem atrofia do músculo esquelético e cardíaco.

Figura 30: O desgaste muscular está diretamente relacionado com o aumento de genes reguladores da atrofia do músculo esquelético.

Figura 31: Tumores PDA induzem empobrecimento do tecido adiposo.

Figura 32: O empobrecimento do tecido adiposo está associado ao aumento da expressão de UCP1.

Figura 33: Aspecto macroscópico do fígado e do baço de camundongos nude controle, sem xenoenxerto; PDX08 - NT, animais transplantados com PDA do

paciente 08 não tratados e PDX12 - NT, animais transplantados com PDA do paciente 12 não tratados.

Figura 34: Esplenomegalia e alteração da massa hepática associada ao PDA.

Figura 35: Aspecto macroscópico do tumor sólido do PDX08.

Figura 36: Aspecto macroscópico do tumor sólido do PDX12.

Figura 37: Carga tumoral em camundongos xenotransplantados com PDA.

Figura 38: Características histopatológicas dos xenoenxertos de PDA.

Figura 39: Avaliação toxicológica da administração crônica de Bj-PRO-10c.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Grupos experimentais utilizados na análise de proliferação celular.

Tabela 2: Sequência dos *primers* utilizados na análise qRT - PCR.

Tabela 3: Amostras de PDA coletadas para a geração de PDXs.

Tabela 4: Grupos experimentais para caracterização do modelo de caquexia baseado em PDX e avaliação do potencial terapêutico do Bj-PRO-10c.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1. Câncer pancreático: um adversário inflexível.....	17
1.2. Caquexia: aspectos clínicos e epidemiológicos	20
1.3. Início da caquexia por inflamação sistêmica crônica.....	25
1.4. Papel do estresse oxidativo como regulador-chave da perda muscular durante a caquexia.....	30
1.5. Angiotensina II como principal mediador da caquexia	34
1.6. Caquexia do câncer: mais do que perda de músculo esquelético	36
1.6.1. Atrofia do músculo esquelético e cardíaco	38
1.6.2. Fígado.....	40
1.6.3. Baço.....	41
1.6.4. Metabolismo energético	43
1.6.5. Cérebro e anorexia.....	48
1.6.6. Deficiências funcionais.....	51
1.7. Modelagem pré-clínica: a importância dos xenotransplantes	52
1.8. Modelo animal de caquexia induzida por xenotransplante de adenocarcinoma pancreático humano	60
1.9. Modulação controlada de óxido nítrico para terapia da caquexia do câncer.....	64
1.10. Peptídeo Potenciador de Bradicinina 10c (Bj-PRO-10c)	69
2. OBJETIVOS	73
2.1. Objetivos gerais	73
2.2. Objetivos específicos.....	73
3. MATERIAIS E MÉTODOS	74
3.1. Metodologia <i>in vitro</i>	74
3.1.1 Síntese e Purificação.....	74
3.1.2 Linhagem e cultivo celular	74
3.1.3. Preparação do meio condicionado.....	76
3.1.4. Ensaio MTT – Viabilidade Celular	76
3.1.5. Detecção da produção de superóxido	77
3.2. Metodologia <i>in vivo</i>	78
3.2.1. Aspectos éticos e normativos	78
3.2.2. Animais	79
3.2.3. Tratamento	79

3.2.4.	Xenotransplantes	80
3.2.5.	Manutenção dos xenotransplantes	81
3.2.6.	Monitoramento animal	81
3.2.7.	Teste de suspensão de quatro membros	82
3.2.8.	Eutanásia e coletas.....	83
3.2.8.	Real Time PCR.....	83
3.2.9.	Análise estatística.....	84
4.	RESULTADOS.....	85
4.1	Efeito do Bj-PRO-10c na viabilidade de mioblastos	85
4.2.	Efeito do Bj-PRO-10c na produção de superóxido	87
4.3.	Geração de xenotransplantes	90
4.4.	Peso corporal	93
4.5.	Anorexia e ingestão de alimentos	102
4.6.	Testes comportamentais para desempenho locomotor espontâneo	103
4.7.	Teste de suspensão de quatro membros.....	107
4.8.	Catabolismo do músculo esquelético e cardíaco	110
4.9.	Tecido adiposo.....	114
4.10.	Inflamação e resposta imune.....	116
4.11.	Características macroscópicas e microscópicas dos tumores.....	118
4.12.	Avaliação toxicológica.....	122
5.	DISCUSSÃO.....	125
5.1.	Parte 1: Modelos animais de caquexia induzida por xenoenxerto de câncer pancreático derivado de paciente.....	125
5.2.	Parte 2: Perspectivas para prevenção e tratamento da caquexia com Bj-PRO-10c	139
6.	CONCLUSÕES	146
7.	REFERÊNCIAS	147
8.	ATIVIDADES COMPLEMENTARES	182
9.	APÊNDICE A – Certificado CEPesq (Hospital Sírio-Libanês).....	185
10.	APÊNDICE B – Certificado CEUA (IQ-USP).....	188
11.	APÊNDICE C – Laudo Anatomopatológico do paciente 08.....	189
12.	APÊNDICE D – Laudo Anatomopatológico do paciente 12.....	191

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer pancreático: um adversário inflexível

O pâncreas é uma glândula essencial para o controle do consumo de energia e do metabolismo que se assemelha estruturalmente às glândulas salivares, embora seja mais flexível e menos compacta do que esses órgãos (Drake et al., 2005). Macroscopicamente, possui forma longa e prismática e divide-se em três principais regiões: cabeça, corpo e cauda (Figura 1) (Braganza, 1994). Na espécie humana, situa-se transversalmente através da parede posterior esquerda da cavidade abdominal, em uma área chamada de retroperitônio, com comprimento entre 14 e 18 cm e peso de 50 a 100 g (Dolensek et al., 2015). Anatomicamente, o pâncreas está conectado a outros órgãos abdominais, incluindo o baço, estômago, duodeno e cólon (Drake et al., 2005).

O pâncreas é composto principalmente de duas partes funcionais: a porção exócrina, que corresponde a 98-99% da massa pancreática total; e a porção endócrina, que corresponde a 1-2% (Saisho, 2016). A glândula exócrina é composta por células acinares poligonais produtoras de enzimas digestivas (o tipo de célula majoritário do órgão) e uma rede de células ductais que produzem bicarbonato e transportam as enzimas digestivas para o intestino (Murtaugh et al., 2015). A função primária do pâncreas exócrino é sintetizar e secretar as enzimas hidrolíticas, que se esvaziam no duodeno, responsáveis pela digestão e absorção dos alimentos e, finalmente, a assimilação de nutrientes (Liu et al., 2018). Já o compartimento endócrino, também conhecido como ilhotas de Langerhans (Chen et al., 2018), abriga cinco tipos celulares que produzem e secretam hormônios que estão diretamente relacionados com a manutenção da homeostase (Ionescu-Tirgoviste et al., 2015): células- α secretam glucagon (Janah et al., 2019); células- β secretam insulina, que junto ao glucagon orchestra uma resposta anabólica integrada à disponibilidade de nutrientes (Petersen et al., 2018); células- δ secretam somatostatina, que desempenha um importante papel ao controlar as células α e β (Rorsman et al., 2018); células- γ secretam polipeptídeo pancreático, que suprime a secreção pancreática e estimula a

secreção gástrica (Lonovics et al., 1981); e as células- ϵ secretam grelina, que afeta os circuitos cerebrais envolvidos no balanço energético, bem como na sensação de recompensa que aumenta o incentivo para comportamentos motivados, como a busca de alimentos (Landgren et al., 2011).

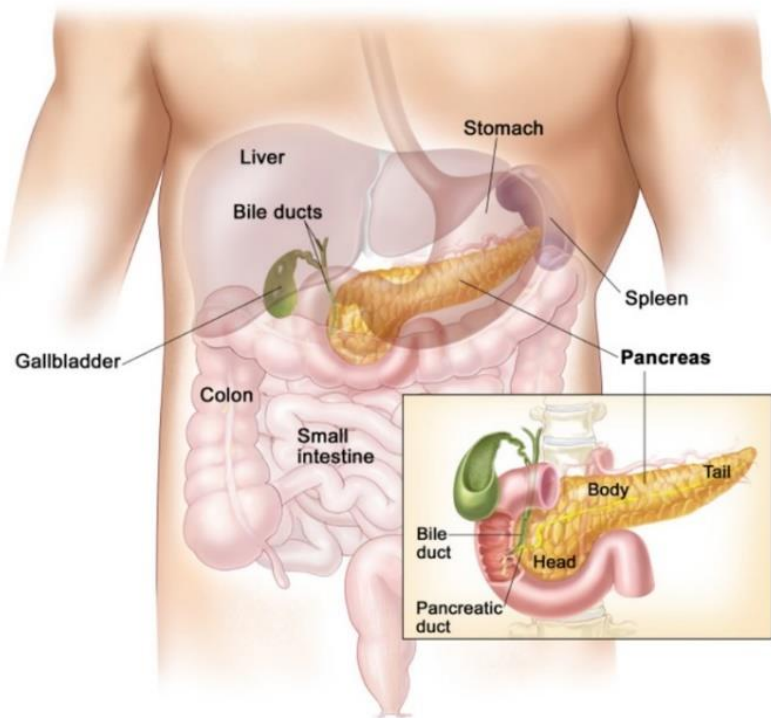


Figura 1: Anatomia do pâncreas. O pâncreas é um órgão retroperitoneal, o que significa que está localizado atrás da cavidade peritoneal, no abdômen. Ele está posicionado transversalmente, estendendo-se horizontalmente da região epigástrica até a região hipogástrica. O pâncreas está localizado na parte superior do abdômen, logo atrás do estômago e em frente à coluna vertebral. Anatomicamente, o pâncreas está dividido em três partes principais: a cabeça, o corpo e a cauda. O pâncreas desempenha um papel vital no sistema digestivo e endócrino, produzindo enzimas digestivas e hormônios, como a insulina e o glucagon. Fonte: PDQ Adult Treatment Editorial Board (2020).

Considerando o importante papel do pâncreas na manutenção da função fisiológica normal, a disfunção pancreática, exócrina ou endócrina, resulta em diferentes patologias, entre as quais o câncer. O câncer de pâncreas, um dos cânceres mais frequentes no mundo, é um dos tipos mais agressivos de câncer humano (Felsenstein et al., 2018), com sobrevida média de 3 a 6 meses e uma taxa de sobrevida em 5 anos inferior a 5% (Lin et al., 2015). O adenocarcinoma ductal

pancreático (PDA) compreende cerca de 90% de todas as neoplasias pancreáticas malignas (Hackeng et al., 2016), frequentemente designado na literatura como sinônimo de câncer pancreático, e pode ser diagnosticado histologicamente por suas características patológicas (Kamisawa et al., 2016): células epiteliais neoplásicas que formam glândulas, invadem o estroma circundante e induzem uma extensa reação inflamatória e desmoplásica (Felsenstein et al., 2018). Exemplos de outras neoplasias pancreáticas malignas incluem tumores neuroendócrinos pancreáticos, neoplasia pseudopapilar sólida, carcinoma de células acinares e pancreatoblastoma, sendo os tumores neuroendócrinos os mais comuns, compreendendo aproximadamente 5% dos tumores malignos do pâncreas (Wolfgang et al., 2013; Bond-Smith et al., 2012).

O problema particular do PDA é multifatorial em sua natureza. Devido à falta de sinais clínicos iniciais, mais de 85% dos pacientes se encontram em estágio metastático avançado no momento do diagnóstico (Von Hoff et al., 2013; Koutsounas et al., 2013). Mais de 80% deles terão tumores irresssecáveis no momento do diagnóstico (Stathis et al., 2010). O prognóstico desfavorável dessa entidade oncológica se deve ao diagnóstico tardio, à biologia agressiva do tumor e à afecção de outros sistemas orgânicos, devido à função e localização anatômica do pâncreas (Mueller et al., 2014). Atualmente, as abordagens para o tratamento de PDA incluem quimioterapia citotóxica, radiação ionizante e ressecção cirúrgica (Paulson et al., 2013), com taxas inevitavelmente elevadas de recorrência (Oberstein et al., 2013).

Os sintomas clínicos do PDA são inespecíficos, como perda de peso e dor abdominal e, portanto, na maioria dos casos, os primeiros sinais passam despercebidos. Além disso, ao contrário dos cânceres de mama, próstata, pele e testículo, não existem exames simples que podem elevar o nível de suspeita, uma vez que o pâncreas é muito profundo para ser palpado e não há exame de sangue específico para PDA. Outros sintomas no diagnóstico podem incluir perda de apetite, náusea, indigestão, diabetes, icterícia e trombose (Oberstein et al., 2013). Dentre os fatores de riscos estão a idade, grupo sanguíneo, microbiota intestinal, susceptibilidade genética, tabagismo, uso de álcool e obesidade (Ilic et al., 2016).

O câncer pancreático se manifesta como uma síndrome, não apenas uma massa tumoral, com comorbidades sistêmicas que têm impacto profundamente negativo na qualidade de vida. Na maioria das circunstâncias, embora não

uniformemente, o PDA avançado ou metastático é clinicamente caracterizado por um paciente moribundo, caquético, imunossuprimido, incapaz de tolerar a quimioterapia convencional e em risco de morte (Hendifar et al., 2018). No entanto, quase um terço das mortes por câncer de pâncreas não se deve à carga tumoral (Henderson et al., 2018), mas sim, a uma enfermidade chamada caquexia.

1.2. Caquexia: aspectos clínicos e epidemiológicos

A caquexia do câncer é uma síndrome complexa multifatorial, envolvendo fatores de sinalização derivados do tumor e do hospedeiro e alterações no metabolismo que levam à degradação das proteínas musculares (Fearon et al., 2012; Ronga et al., 2014). Ao longo dos anos, várias definições foram propostas pelos pesquisadores para definir a caquexia e evoluíram com o tempo. Em 2011, um painel de especialistas participou de um processo formal de consenso, formalizando a seguinte definição: “a caquexia é uma síndrome metabólica complexa definida por perda contínua de massa muscular esquelética (com ou sem perda de massa gorda) que não pode ser totalmente revertida pelo suporte nutricional convencional e leva ao comprometimento funcional progressivo do organismo” (Fearon et al., 2011). Essa condição destrutiva é responsável pelo comprometimento da função física (Moses et al., 2004); redução da qualidade de vida e sobrevida (Fearon et al., 2006); astenia; anemia; e leva ao estado de desnutrição devido à indução de anorexia ou diminuição da ingestão de alimentos (Bosaeus et al., 2001). Como resultado de todos esses efeitos negativos, o corpo começa a se desgastar. A caquexia pode ocorrer também como doença subjacente no curso de doenças benignas crônicas, como insuficiência cardíaca crônica ou doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), bem como no curso de doenças infecciosas, como tuberculose ou infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV). No entanto, é mais frequentemente observado concomitantemente com doenças malignas, especialmente no câncer de pâncreas, pulmão, estômago, esôfago, colón e reto (Mueller et al., 2014; Santillán-Díaz et al., 2018). Além disso, a caquexia afeta negativamente a capacidade dos pacientes em combater processos infecciosos e diminui a tolerância e resposta ao tratamento antineoplásico (Bachmann et al., 2008).

Atualmente, essa síndrome multifatorial que atinge múltiplos órgãos têm sido considerada um assassino silencioso, característica mais devastadora e potencialmente fatal do câncer (Penet et al., 2015). A doença acomete cerca de 60% a 80% dos pacientes com câncer terminal, sendo responsável por cerca de 22% das mortes de pacientes com câncer (Skipworth et al., 2007). Nesse caso, os pacientes apresentam resposta reduzida à terapia, tolerância, redução da qualidade de vida e sobrevida inferior a 3 meses (Fearon et al., 2011). Mais especificamente, no que se refere à caquexia do câncer, que acomete mais crianças e idosos, apresenta maior prevalência nos casos de câncer pancreático, gástrico e esofágico (Baracos et al., 2018) (Figura 2). Quanto mais avançada a caquexia, pior será a resposta ao tratamento antineoplásico e o resultado clínico, resultando em uma hospitalização mais longa, mais frequente e dispendiosa. Usando dados da Amostra de Internação Nacional, estimou-se a prevalência anual de admissões atribuídas à caquexia em hospitais comunitários nos EUA em mais de 160.000 casos, com duração média da permanência em 6 dias, em comparação com 3 dias para internações sem caquexia. Já o custo médio por hospitalização foi superior a US \$ 10.000 por caso de caquexia (US \$ 4.000 a mais do que em pacientes não caquéticos) (Arthur et al., 2014). O paciente caquético morre quando a perda corporal total atinge cerca de 25 a 30% (Dhanapal et al., 2011); no entanto, a perda de peso por si só não pode ser um fator prognóstico, porque não reflete o escopo completo das alterações patológicas ou o impacto clínico da caquexia.

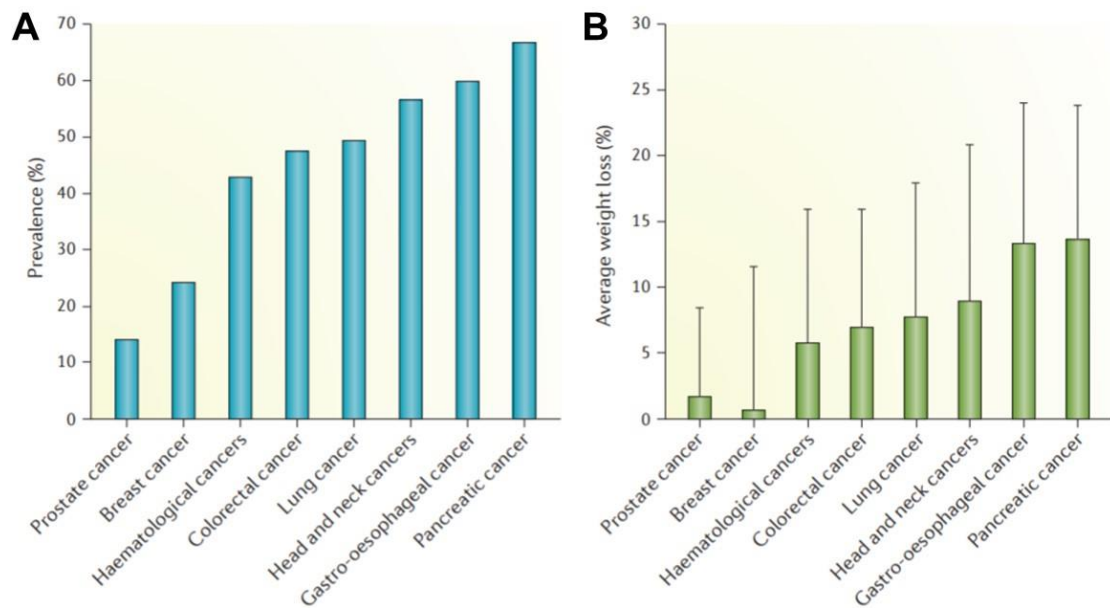


Figura 2: Caquexia do câncer por local do tumor. (A) Prevalência de caquexia por local do câncer e **(B)** porcentagem média de perda de peso por local do câncer. Fonte: Baracos et al. (2018).

Fearon et al. (2011) propuseram um sistema de estadiamento distinto em três níveis de relevância clínica (Figura 3): pré-caquexia, caquexia e caquexia refratária, porém, nem todos os pacientes atravessam todo o espectro. O risco de progressão depende da presença de inflamação sistêmica, bem como o tipo e estágio do câncer, ingestão de alimentos e resposta ao tratamento antineoplásico. O estágio pré-caquético é designado por sinais clínicos e metabólicos precoces, como a anorexia, intolerância à glicose, aumento do baço, redução da massa de tecido adiposo branco e perda involuntária de peso inferior a 5% (Blum et al., 2014). Para ser categorizado como caquético com base na classificação consensual internacional, deve ser observado um dos três critérios apresentados: perda de peso superior a 5% durante os últimos 6 meses; índice de massa corporal (IMC) inferior a 20 kg / m² e perda de peso contínua superior a 2%; ou sarcopenia e perda contínua de peso superior a 2% (Fearon et al., 2011). Na caquexia refratária, a caquexia pode ser clinicamente refratária devido ao câncer muito avançado (pré-terminal) ou a presença de câncer com rápida progressão que não responde mais ao tratamento antineoplásico. Esse estágio está associado ao catabolismo ativo ou à presença de fatores que tornam a manutenção da perda de peso não mais possível ou apropriada. A caquexia refratária é caracterizada por um baixo status de desempenho (score da OMS 3 ou 4) e

expectativa de vida inferior a 3 meses. Nessa fase, as intervenções terapêuticas concentram-se tipicamente em aliviar as consequências e complicações da caquexia - por exemplo, controle de sintomas (estimulação do apetite e tratamento de náuseas) e o cuidado geral de acordo com as diretrizes de cuidados de fim de vida (Blum et al., 2014).

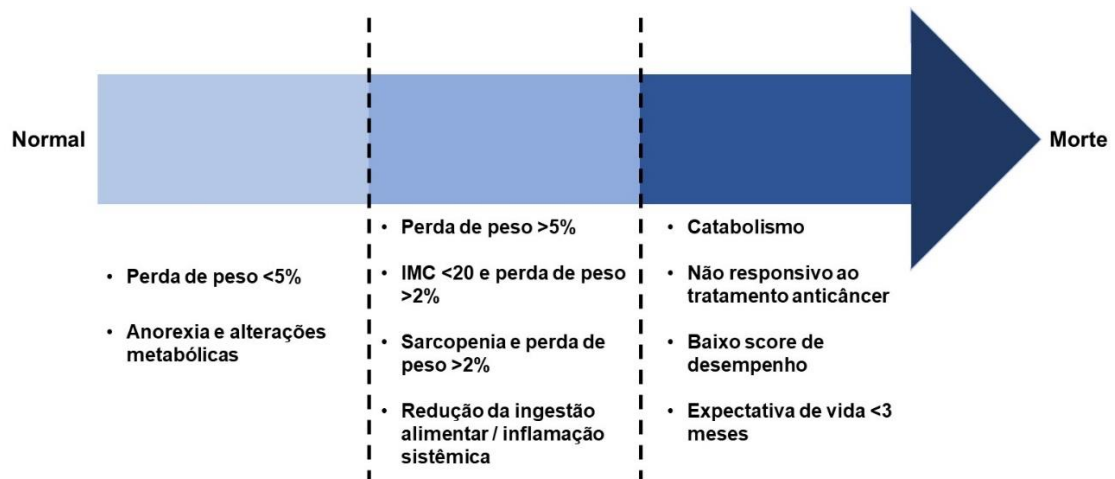


Figura 3: Espectro caquético associado ao câncer. A caquexia é um processo progressivo que abrange três estágios de relevância clínica. O primeiro estágio é conhecido como pré-caquexia, onde ocorre perda de peso e diminuição do apetite, sem uma perda significativa de massa muscular. Em seguida, ocorre a transição para a caquexia propriamente dita, que é caracterizada pela perda de peso mais acentuada, acompanhada de uma significativa perda de massa muscular. Nesse estágio, os sintomas se agravam, com a fraqueza e a fadiga se tornando mais intensas, além de uma diminuição ainda maior do apetite. Por fim, quando o paciente alcança o estágio da caquexia refratária, ocorre uma deterioração ainda mais severa, com uma perda de peso grave e uma redução significativa da massa muscular. Nesta fase, a resposta aos tratamentos convencionais se torna limitada, e os sintomas são mais debilitantes, afetando negativamente a qualidade de vida do paciente. Legenda: IMC – Índice de massa corporal. Adaptado de Fearon et al. (2011).

Um dos problemas associados à caquexia do câncer se deve a dificuldade de padronização dos critérios diagnósticos e, portanto, a caquexia no paciente com câncer geralmente não é tratada (Vanhouette et al., 2016). Sendo assim, a fim de transformar a definição de estágios de caquexia em critérios de diagnóstico, os pesquisadores também desenvolveram um escore de estadiamento da caquexia

(CSS) para pacientes com câncer avançado que consiste em cinco componentes principais da caquexia (perda de peso, função muscular, apetite, status de desempenho e bioquímica anormal) (Zhou et al., 2018):

- I. Perda de peso em 6 meses (faixa de 0 a 3);
- II. Um questionário SARC-F que avalia a função muscular e a sarcopenia (intervalo de pontuação de 0 a 3);
- III. Status de desempenho do Grupo de Oncologia Cooperativa Oriental (ECOG) para refletir a função física (intervalo de pontuação, 0–3);
- IV. Classificação numérica relatada pelo paciente para avaliar a perda de apetite (intervalo de pontuação, 0–2);
- V. Bioquímica anormal pela avaliação de leucócitos, hemoglobina e albumina (intervalo de pontuação, 0–2);
 - i. Não caquexia (escore 0–2);
 - ii. Pré-caquexia (escore 3-4);
 - iii. Caquexia (escore 5–8);
 - iv. Caquexia refratária (escore 9 a 12).

A caquexia é clinicamente evidente em sua fase refratária (com perda bruta de gordura e músculo esquelético) e, como tal, tem sido reconhecida como um efeito adverso do câncer desde a época de Hipócrates (Fearon et al., 2013). No entanto, nesta fase tardia, a janela de oportunidades para uma reabilitação bem-sucedida dos pacientes já passou há muito tempo. Contra esse espectro, haveria mérito em reconhecer o início da caquexia, para que intervenções para reduzir ou retardar seu efeito possam ser implementadas (Fearon, 2008). Um estudo prospectivo multicêntrico de coorte revelou que até 71% dos indivíduos com diagnóstico de câncer de pâncreas apresentaram caquexia no momento do diagnóstico, porém apenas 56% receberam orientação nutricional (Latenstein et al., 2020). Assim, é de suma importância que o estado nutricional seja cuidadosamente acompanhado para prevenir o surgimento de caquexia e desnutrição (Emanuel et al., 2022). Detectar precocemente os pacientes em risco de desnutrição e caquexia associadas ao câncer, bem como prover apoio nutricional adequado e imediato, emerge como uma medida essencial desde as fases iniciais da doença pancreática. Essa abordagem pode repercutir positivamente nos desfechos terapêuticos e na qualidade de vida dos

pacientes. Contudo, para que isso aconteça, seria necessária uma definição do escopo completo das alterações fisiopatológicas e o reconhecimento de seus indicadores de diagnóstico (Kaasa et al., 2008).

1.3. Início da caquexia por inflamação sistêmica crônica

A resposta inflamatória sistêmica é a principal força motriz das alterações metabólicas observadas na caquexia (Argilés et al., 2012). Células tumorais e células imunes ativadas liberam citocinas, quimiocinas e outros mediadores que induzem alterações intracelulares diretamente associadas à inflamação persistente (Coussens et al., 2002). Essas moléculas de sinalização são sintetizadas por células tumorais ou imunológicas e suas atividades são suficientes para promover o catabolismo em órgãos-alvo, como o músculo esquelético. De fato, citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α); interleucina -1, -6 e -8 (IL-1, IL-6 e IL-8); e o interferon gama (IFN- γ), são comumente classificados como fatores pró-caquéticos e ajudam a direcionar o fenótipo debilitante associado a essa síndrome (Argilés et al., 2014).

O TNF- α , denominado inicialmente como “caquectina” (Cerami et al., 1985), é provavelmente a citocina mais caracterizada na caquexia, pois promove um conjunto complexo de eventos de sinalização pós-receptor que causam respostas específicas do tipo celular. Dentre as principais vias mediadas pela resposta ao TNF- α , a sinalização catabólica induzida pela ativação da translocação nuclear do fator de transcrição citoplasmático fator nuclear kappa B (NF- κ B) desempenha um papel fundamental na degradação de proteínas associada à caquexia. O NF- κ B é um complexo multiproteico inativado no citoplasma por associação com seu inibidor I κ B, e apenas se transloca para o núcleo após a dissociação do complexo NF- κ B / I κ B (Han et al., 1999). Nesta via, o TNF- α se liga ao receptor 1 do fator de necrose tumoral (TNFR1) e estimula uma cascata de eventos que resulta na degradação proteossomal de I- κ B α , a proteína que inibe o NF- κ B. O TNF- α , portanto, promove a ativação do NF- κ B e causa sua translocação para o núcleo (Patel et al., 2017). A ativação de NF- κ B regula positivamente a expressão de citocinas, e um loop de feedback positivo é

estabelecido (Wang et al., 2002), resultando na super estimulação do NF- κ B e na degradação das proteínas musculares por meio da produção incessante de citocinas catabólicas (Zhou et al., 2003). Após se ligar ao receptor TNFR1, o TNF- α promove a rápida ativação de NF- κ B em células do músculo esquelético, incluindo miotubos diferenciáveis (Li et al., 1999) e mioblastos indiferenciáveis (Guttridge et al., 1999). Os eventos desencadeados pela ligação do TNF- α ao receptor também estimula a produção mitocondrial de espécies reativas de oxigênio (ROS), processo que parece ser essencial para a ativação do NF- κ B no músculo diferenciado (Li et al., 2000).

O NF- κ B estimula a degradação proteica por meio de efeitos na expressão do gene muscular. Os alvos mais prováveis são os genes que regulam o sistema ubiquitina-proteassoma (UPS). A via da UPS atua como o principal mecanismo para o catabolismo de proteínas intracelulares, responsável pela proteólise regulada, progressão do ciclo celular, regulação da transcrição, integridade do genoma, apoptose e respostas imunes (Thibaut et al., 2019). No caso do músculo esquelético, aumentos no UPS estão associados à perda de massa muscular (Bodine et al., 2014). Sugere-se que o UPS contribui para a atrofia do músculo em pacientes com caquexia pelo aumento da expressão de ligases de ubiquitina (Bossola et al., 2003). Adicionalmente, a quimioterapia também estimula a ativação do NF- κ B, induzindo o desperdício de massa magra (Damrauer et al., 2018). Portanto, mais um dos efeitos que leva à perda de peso em pacientes com câncer, especialmente pancreático, seria a ativação do NF- κ B, promovida pela quimioterapia. No geral, esses dados indicam que o TNF- α pode promover a degradação da proteína por ação direta no músculo maduro.

Antes que possam ser degradadas pelo UPS, as proteínas devem primeiro ser direcionadas para a conjugação a moléculas de ubiquitina. A rápida conjugação da ubiquitina às proteínas musculares também é desencadeada por sinalização NF- κ B estimulada por TNF- α (Patel et al., 2017). Neste processo, os substratos são marcados para degradação através da ligação de uma cadeia de poliubiquitina por uma série de etapas enzimáticas mediadas pela enzima ativadora de ubiquitina (E1), a enzima conjugadora de ubiquitina (E2) e as ligases de proteína ubiquitina (E3). Primeiramente, a enzima E1 ativa a ubiquitina e, em seguida, é deslocada para o sítio ativo da proteína E2. As enzimas de conjugação da ubiquitina (E3) são reconhecidas pela E2 ligada, que permite a ocorrência de reações de conjugação pela formação da

cadeia das ubiquitinas ligando-se umas às outras e ao substrato proteico. Adicionalmente, o proteassoma apenas pode reconhecer uma proteína selecionada depois de ser direcionada pela ubiquitina e, em seguida, processada em peptídeos menores (Leitner et al., 2017) (Figura 4).

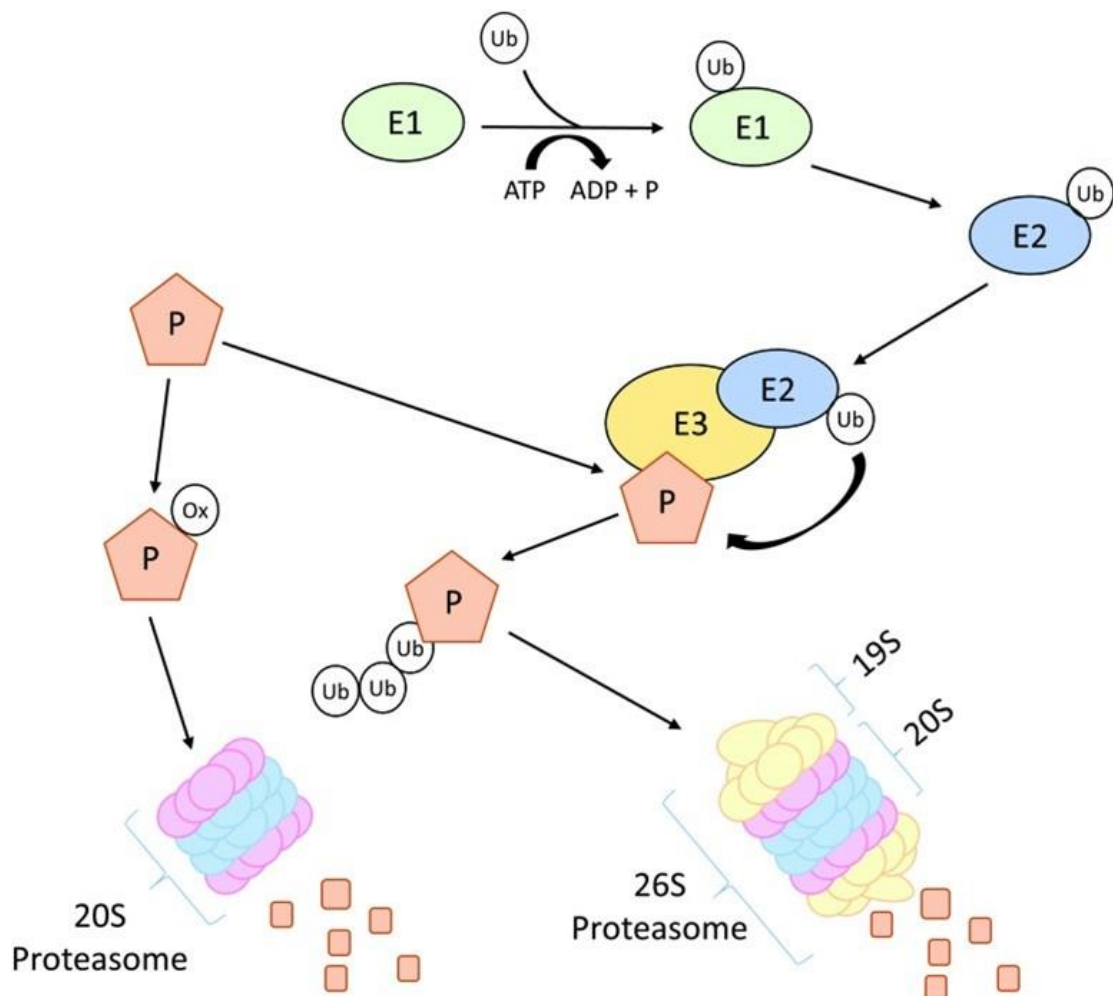


Figura 4: Visão esquemática da via UPS. A via da ubiquitina proteassoma (UPS) é um sistema intracelular responsável pela degradação de proteínas específicas que são marcadas pela adição de moléculas de ubiquitina, atuando como uma "etiqueta" para sinalizar sua degradação. A ubiquitina é ligada às proteínas alvo através de uma série de reações enzimáticas que envolvem três tipos de enzimas: as ubiquitinas ligases (E3), as ubiquitinas conjugadoras (E2) e as ubiquitinas ativadoras (E1). Uma vez que a proteína é marcada com várias moléculas de ubiquitina, ela é direcionada para o proteassoma, uma grande estrutura proteica, onde ocorre a degradação. A via UPS desempenha um papel essencial na regulação de muitos processos celulares, como a degradação de proteínas danificadas, a regulação da

expressão gênica e a eliminação de proteínas desnecessárias ou disfuncionais. Fonte: Leitner et al. (2017)

Durante a proteólise, o NF- κ B regula duas principais ubiquitina ligases E3, MAFbx / Atrogin-1 (*Muscle Atrophy F-box*) e MuRF1 (*Muscle RING-Finger 1*) (de Palma et al., 2008), do UPS, que são ativas na atrofia do músculo e desempenham um papel proeminente no músculo esquelético degradado na caquexia do câncer. Ainda que as muitas funções de MuRF1 e Atrogin-1 no músculo esquelético continuem a ser investigadas, acredita-se que envolvam a ligação de substratos seletivos para ubiquitinação e subsequente degradação pelo proteassoma. A descoberta desses genes rendeu dois marcadores com características de reguladores-chave da atrofia do músculo esquelético: (I) ambos os genes são expressos seletivamente no músculo estriado; (II) ambos os genes são expressos em níveis relativamente baixos no músculo esquelético em repouso e (III) a expressão de ambos os genes aumenta rapidamente no início de uma variedade de estressores e antes do início da perda muscular (Bodine et al., 2014). Essa via foi estimulada tanto em modelos pré-clínicos quanto em pacientes caquéticos com câncer (Khal et al., 2005; Wyke et al., 2005), sugerindo que o sistema contribui para a atrofia do músculo em pacientes com caquexia e tem um papel chave na progressão da doença. Estudos iniciais demonstraram que após três dias de suspensão unilateral do vasto lateral e imobilização do membro, aumentos dessas ligases E3 foram identificadas em biópsias humanas (Gustafsson et al., 2010). Da mesma forma, após a imobilização em humanos leva a aumentos desses genes no músculo esquelético (Abadi et al., 2009). Assim, o aumento da expressão de mRNA de MuRF1 e Atrogin-1 após um estressor indutor de atrofia, como por exemplo a caquexia, pode ser um dos responsáveis pela perturbação do equilíbrio entre síntese e degradação de proteínas e, portanto, os dois genes foram reconhecidos como marcadores-chave de atrofia muscular.

Outro candidato que pode cooperar com o TNF- α , ou agir sozinho como impulsor da inflamação sistêmica na caquexia do câncer é a IL-6. A IL-6 é produzida a partir de macrófagos ativados e / ou outras células no microambiente tumoral e está amplamente ligada a eventos de caquexia e metástase (Loberg et al., 2007), e interferir em sua sinalização prejudica tanto a carga tumoral quanto a caquexia (Miller et al., 2017). Os níveis circulantes de IL-6 mostraram se correlacionar

com a perda de peso em pacientes com câncer e, mais importante, os níveis de IL-6 se correlacionam com a sobrevivência reduzida (Moses et al., 2009). Além de seus efeitos pró-inflamatórios, a IL-6 junto com outras citocinas, promove a mobilização de lipídios (Payen et al., 2016), induz a perda muscular e atrofia (Baltgalvis et al., 2014), autofagia sistêmica (Pettersen et al., 2017), degradação da matriz extracelular, promoção da invasão de células tumorais na circulação (Grivennikov et al., 2010), crescimento de células cancerosas em locais secundários (McAllister et al., 2014) e estimula o fígado a induzir uma resposta de fase aguda (Chasen et al., 2014).

O padrão de sinalização da IL-6 se dá através de seu receptor ligado à membrana e formação de um heterodímero pelo receptor de transdução de sinal (gp130). Isso leva à ativação da via JAK / STAT com translocação de proteínas STAT ativadas para o núcleo, onde funcionam para aumentar a transcrição de genes contendo elementos responsivos a STAT em seus promotores (Heinrich et al., 2003). IL-6 pode ativar STAT-1 e STAT-3, no entanto, STAT-3 demonstrou ter um papel mais pronunciado na via de sinalização de IL-6 (Crocker et al., 2003). Os alvos transcricionais de STAT-3 estão envolvidos em várias funções celulares, incluindo função imunológica, proliferação e crescimento celular, diferenciação e possivelmente apoptose (Clarkson et al., 2006). O receptor gp130 é encontrado na maioria dos tecidos em todo o corpo, permitindo efeitos potentes e diversos da IL-6, especialmente durante condições de expressão intensificada, incluindo câncer e caquexia. Adicionalmente, a IL-6 também promove a ativação do NF- κ B, resultando na superestimulação dessa via e na degradação de proteínas musculares por meio da produção de citocinas catabólicas (Zhou et al., 2003).

Outro candidato interessante para caquexia é o interferon-gama (IFN- γ). O IFN- γ , originalmente denominado fator ativador de macrófagos, é uma citocina pró-inflamatória produzida por células natural killer (NK) e linfócitos (Schroder et al., 2004). IFN- γ tem efeitos sinérgicos com TNF- α na ativação de NF- κ B em cultura de células e modelos de camundongos (Paludan et al., 2000). Em um estudo, camundongos inoculados com tumores produtores de IFN- γ desenvolveram caquexia. Após a administração de um anticorpo monoclonal contra IFN- γ , os camundongos pararam de perder peso (Matthys et al., 1991). Em miotubos, a ação sinérgica do TNF- α junto ao IFN- γ reduz a expressão da proteína miosina (responsável pela contração

muscular) e do mRNA por meio de um mecanismo dependente de RNA (Acharyya et al., 2004). Esses estudos suportam uma ação pró-catabólica para IFN- γ .

Dada a etiologia heterogênea e multifatorial da caquexia, é provável que essa síndrome seja resultado da desregulação de múltiplas vias de sinalização. Além da resposta inflamatória associada mediada por citocinas, outros mediadores também identificados na fisiopatologia da caquexia incluem hormônios catabólicos como os glicocorticóides, fatores de crescimento, componentes do sistema renina-angiotensina, particularmente a angiotensina II (Ang II) e espécies reativas de oxigênio / nitrogênio (ROS e RNS) (Leitner et al., 2017; Graul et al., 2016).

1.4. Papel do estresse oxidativo como regulador-chave da perda muscular durante a caquexia

“Viver com o risco de estresse oxidativo é um preço que os organismos aeróbicos devem pagar por uma bioenergética mais eficiente” (Skulachev, 1996). Estresse oxidativo é uma expressão usada para descrever processos deletérios resultantes de um desequilíbrio pró-oxidante-antioxidante em favor do primeiro, levando a interrupção da sinalização e controle redox e / ou dano molecular (Sies, 2015). Os fatores desencadeadores do estresse oxidativo podem ser diversos, desde defeitos genéticos hereditários ou adquiridos (mutações) ou ambientais (radiação ou toxinas) até distúrbios metabólicos (Andreyev et al., 2005). Evidências sugerem que o estresse oxidativo pode ser responsável, em diferentes graus de importância, pelo aparecimento e progressão de doenças como câncer, diabetes, distúrbios metabólicos, aterosclerose e doenças cardiovasculares (Taniyama et al., 2003).

Especificamente, o estresse oxidativo surge quando a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS) supera as defesas antioxidantes intrínsecas (Burton et al., 2011). ROS é um termo usado para descrever uma variedade de moléculas e radicais livres (espécies químicas com um elétron desemparelhado) derivados do oxigênio molecular (Turrens et al., 2003). Da mesma forma, RNS se refere não apenas a radicais centrados em nitrogênio, mas também inclui derivados não radicais, onde o centro reativo é o nitrogênio (Powers et al., 2008).

Processos, como fosforilação de proteínas, ativação de fatores de transcrição, apoptose, imunidade e diferenciação, são todos dependentes de uma produção adequada de espécies reativas e da presença dentro das células que precisam ser mantidas em níveis baixos (Rajendran et al., 2014).

Em condições fisiológicas, o radical livre de oxigênio mais comum é o ânion superóxido (O_2^-). *In vivo*, o superóxido é produzido enzimaticamente e não enzimaticamente. As fontes enzimáticas incluem enzimas nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidases, óxido nítrico sintase (NOS) e xantina oxidase (XO) (Takimoto et al., 2007). Já a produção não enzimática ocorre quando a transferência de elétrons ao longo das enzimas da cadeia respiratória mitocondrial não é totalmente eficiente, e o vazamento de elétrons para o oxigênio molecular resulta na formação de superóxido, constituindo a fonte primária de O_2^- na maioria dos tecidos (Cadenas et al., 2000). A taxa de formação é determinada pelo número de elétrons presentes na cadeia, logo, é elevada em condições de abundância de oxigênio e glicose. Em contraste, também aumenta em condições de hipóxia, quando a disponibilidade reduzida de oxigênio para atuar comoceptor final de elétrons faz com que os elétrons se acumulem. Em condições fisiológicas, cerca de 2% do oxigênio consumido é convertido em superóxido nas mitocôndrias, em vez de ser reduzido a água (Burton et al., 2011). Comparado com outros tecidos, o músculo esquelético possui elevado número de mitocôndrias e, portanto, a contribuição dessa via para o estresse oxidativo é muito relevante (Ábrigo et al., 2018). Embora este ânion seja relativamente impermeável à membrana (devido à carga negativa), em comparação com outros radicais livres, o superóxido tem uma meia-vida moderadamente longa que permite a difusão dentro da célula e, portanto, aumenta o número de potenciais alvos (Powers et al., 2008).

Assim, ainda que a produção de superóxido (junto das espécies reativas secundárias que ele gera) se apresente como um processo contínuo e fisiológico, cumprindo funções biológicas relevantes em todas as células (incluindo células do músculo esquelético), dependendo da sua origem, localização, quantidade, estabilidade e reatividade, a sinalização mediada pelas espécies reativas pode participar de processos fisiológicos normais ou contribuir para uma resposta mal adaptativa que leva à disfunção metabólica e sinalização inflamatória (Forrester et al., 2018).

Os efeitos oxidativos do superóxido podem ser diretos ou indiretos. Normalmente, o nível de superóxido é mantido baixo porque é desintoxicado pela enzima superóxido dismutase (SOD) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e, eventualmente, em oxigênio e água pela catalase ou glutatona peroxidase (Korsager et al., 2016). No entanto, esses sistemas antioxidantes não são perfeitos, e o superóxido pode acumular e danificar diretamente (via modificação oxidativa) proteínas, lipídios e DNA. Embora o peróxido de hidrogênio produzido pela SOD seja relativamente não reativo, ele pode formar radicais hidroxila altamente reativos que podem iniciar cascatas de peroxidação lipídica nas membranas. Além disso, os produtos da oxidação de carboidratos, proteínas e lipídios podem causar danos secundários às proteínas, que podem perder a função catalítica e sofrer degradação seletiva (Brand et al., 2004). Os efeitos indiretos do superóxido se dão por meio da interação entre superóxido e óxido nítrico (NO). Essa interação resulta na perda da biodisponibilidade do NO (e de suas propriedades reguladoras), bem como na formação de peroxinitrito ($ONOO^-$) (Guzik et al., 2003). No caso de aumento dos níveis plasmáticos de superóxido, a reação entre o NO e O_2^- para formar $ONOO^-$ se torna muito rápida, onde a taxa de produção é cerca de três vezes maior que a taxa de decomposição do superóxido pela superóxido dismutase (Korhonen et al., 2005). A formação excessiva de peroxinitrito pode provocar inibição da respiração mitocondrial, disfunção proteica, esgotamento da energia celular, danos às membranas celulares e ao DNA (van der Vliet et al., 1999).

O interesse atual na ligação do estresse oxidativo às respostas inflamatórias tem gerado novas perspectivas, principalmente por causa do seu papel aceito como um dos principais contribuintes para a etiologia de patologias que levam à desregulação do equilíbrio anabólico / catabólico (Ábrigo et al., 2018). Propõe-se pelo menos quatro mecanismos que podem aumentar a taxa de proteólise e atrofia do músculo esquelético sob condições de estresse oxidativo (Mantovani et al., 2008): (I) redução da ingestão alimentar devido a sintomas como anorexia, náuseas e vômitos com fornecimento inadequado de nutrientes, incluindo antioxidantes; (II) alterações metabólicas que não permitem a síntese adequada de compostos redutores (Macciò et al., 2009); (III) inflamação crônica relacionada a ativação do sistema imune com produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias, que levam ao aumento da produção de ROS (Mantovani et al., 1998) e (IV) o uso de drogas antineoplásicas

(como agentes alquilantes e principalmente cisplatina) que são capazes de produzir excesso de ROS (Weijl et al., 1997).

Pacientes caquéticos exibem níveis aumentados de espécies reativas de oxigênio no músculo esquelético e modificações de proteínas suscetíveis à oxidação, sugerindo o envolvimento do estresse oxidativo na caquexia (Laviano et al., 2007). Especificamente, os pacientes com câncer apresentam níveis elevados de ROS e níveis reduzidos de antioxidantes no soro (Barreiro et al., 2005). Ao avaliar 120 pacientes com câncer e 60 indivíduos saudáveis, Mantovani et al. (2003) descobriram que os níveis de ROS eram significativamente mais elevados e as atividades das enzimas antioxidantes, em específico, superóxido dismutase e glutathione peroxidase, eram significativamente menores em pacientes com câncer avançado do que em indivíduos controle. Da mesma forma, Sullivan-Gunn *et al.* demonstraram um aumento de 40% dos níveis de superóxido nos músculos de camundongos caquéticos, atribuído à redução da atividade das enzimas antioxidantes endógenas (Sullivan-Gunn et al., 2011). Mitocôndrias danificadas também estão presentes no músculo durante a caquexia do câncer (Fearon et al., 2011) e isso está associado à perda da integridade estrutural do músculo esquelético. Na verdade, mitocôndrias danificadas não são apenas menos bioenergeticamente eficientes, mas também interferem nos mecanismos de controle de qualidade celular, apresentam uma tendência maior de desencadear a apoptose dos miócitos e geram maiores quantidades de ROS, devido ao mecanismo de transferência de elétrons deficiente (Mantovani et al., 2012). Além disso, em uma série de estudos complementares, o estresse oxidativo mostrou estar associado a altos níveis de citocinas pró-inflamatórias envolvidas na patogênese da caquexia, como IL-1, IL-6 e TNF- α (Smith et al., 2003; Strassmann et al., 1992; Gelin et al., 1991). Por fim, o aumento do estresse oxidativo é frequentemente acompanhado da estimulação do UPS (Gomes-Marcondes et al., 2002). Experimentos envolvendo miócitos C2C12 mostraram claramente que ROS induz as ligases E3 (Gomes-Marcondes et al., 2002), sugerindo degradação aumentada de proteínas pelo proteassoma. No entanto, na caquexia, outro subtipo de proteassoma (20S), que degrada proteínas oxidadas sem modificação prévia por ubiquitinação, também é regulado positivamente, o que reforça a noção de que níveis elevados de ROS no músculo caquético estão envolvidos na patologia (Nakayama et al., 2016). Deste modo, esses resultados sugerem que os

sistemas redox do corpo, que incluem defesas antioxidantes, podem estar desregulados em pacientes com caquexia do câncer, e esse desequilíbrio pode aumentar a progressão da doença.

1.5. Angiotensina II como principal mediador da caquexia

Após a descoberta da renina em 1898, o angiotensinogênio e a enzima conversora da angiotensina (ECA) foram identificados como componentes-chave adicionais do sistema renina-angiotensina (RAS) (Figura 5) (Corrêa et al., 2015). O angiotensinogênio, precursor da angiotensina, é uma α -glicoproteína produzida principalmente pelo fígado e liberada na circulação sistêmica, onde é convertida em angiotensina I (Ang I) sob atividade da renina. Sob ação da ECA, a Ang I é clivada no componente ativo angiotensina II (Ang II), o principal regulador a montante do câncer pré-caquexia e caquexia (Yoshida et al., 2015).



Figura 5: Esquema de funcionamento do sistema renina-angiotensina. Nesse sistema, a renina liberada pelos rins age sobre o angiotensinogênio, produzido no fígado, para gerar a angiotensina I, uma forma inativa do hormônio. Posteriormente, a enzima de conversão da angiotensina (ECA) promove a conversão da angiotensina I em angiotensina II, que é a forma ativa do hormônio.

Em humanos, os principais efeitos fisiológicos da Ang II são mediados por receptores AT_1R localizados nos rins, músculo liso vascular, pulmão, coração, cérebro, adrenais, glândula pituitária e fígado. Ao ligar-se a Ang II, AT_1R estimula a vasoconstrição, retenção de sódio, ativação nervosa simpática e geração de ROS, juntamente com efeitos deletérios, incluindo disfunção endotelial e indução de processos inflamatórios, trombóticos, proliferativos e fibróticos (Frantz et al., 2018). Já o receptor AT_2R é expresso em células endoteliais vasculares, cérebro, glândulas

adrenais, ovários e estruturas cutâneas, renais e cardíacas (Steckelings et al., 2005). Embora seu nível de expressão seja inferior ao dos receptores AT₁R, os receptores AT₂R desempenham um papel substancial na regeneração de tecidos e, em condições como isquemia ou lesão, a expressão pode ser aumentada. Os principais efeitos biológicos do receptor AT₂R são regularmente opostos aos receptores AT₁R, com foco na vasodilatação, antiproliferação e antiinflamação. A estimulação dos receptores AT₂R confere proteção contra a superestimulação dos receptores AT₁R. A título de exemplo, a vasoconstrição mediada pelos receptores AT₁R pode ser combatida pelos efeitos vasodilatadores da Ang II ligada ao receptor AT₂R (Carey et al., 2000).

A caquexia e a perda do músculo esquelético induzida por Ang II pode ser desencadeada através de diversos mecanismos de relevância clínica. O catabolismo da massa muscular induzido pela Ang II se deve ao aumento da degradação de proteínas através da expressão aumentada do UPS (Song et al., 2005). Adicionalmente, evidências propõem que a Ang II promove a produção de TNF- α e IL-6 em monócitos periféricos humanos e os inibidores da ECA inibem a produção de TNF- α induzida por LPS (Peeters et al., 1998). O aumento da degradação de proteínas e da expressão de ubiquitina ligases induzidas por Ang II *in vivo* são bloqueadas pela expressão específica de IGF-I (fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1) no músculo, sugerindo que níveis circulatórios elevados de IGF-I podem ser capazes de suprimir o efeito catabólico da Ang II (Song et al., 2005). No entanto, sabe-se que a desnutrição associada à caquexia do câncer reduz os níveis de IGF-I (Pollak et al., 2004), logo, o efeito catabólico da Ang II pode ser máximo no estado caquético.

A Ang II tem sido relacionada com o aumento do estresse oxidativo por aumentar a produção celular de ROS via ativação da NADPH oxidase, levando a proteólise muscular (Zhao et al., 2006). Ao se ligar ao AT₁R, a Ang II induz a adenina dinucleotídeo fosfato oxidase (NADPH-NOX) para produzir ROS, como o superóxido, abrindo os canais de potássio mitocondriais dependentes de ATP, resultando no aumento na produção de ROS mitocondriais (mtROS) (Schulz et al., 2014), capazes de promover a transcrição de genes que codificam as ubiquitina ligases (MuRF1 e Atrogin-1) (Leitner et al., 2017).

A redução do apetite induzida pela Ang II atua diretamente sobre os neurônios hipotalâmicos para regular a ingestão alimentar via regulação de neuropeptídeos orexígenos / anorexígenos. Camundongos deficientes em AT₁R são hiperfágicos e obesos com aumento da adiposidade (Yamamoto et al., 2011). Em outro estudo, ao administrar captopril, inibidor da enzima conversora de angiotensina (ECA), Kloet et al. (2009) relataram a diminuição da ingestão de alimentos, provavelmente devido a um aumento da Ang II no cérebro, que foi convertido a partir do aumento da Ang I. O captopril inibe a conversão de Ang I em Ang II, de modo que a concentração de Ang I plasmática aumenta. Devido às suas propriedades hidrofílicas, o captopril não atravessa prontamente a barreira hematoencefálica e o aumento de Ang I circulante leva ao aumento de Ang II no cérebro. Ao empregar um inibidor da ECA, estudos denotam que a inibição da Ang II evita a degradação proteica no músculo esquelético e melhora a perda de peso (Sanders et al., 2005; Yoshida et al., 2013). Este efeito sublinha o crosstalk órgão-órgão existente por trás das condições caquexia-patológicas. De fato, embora o principal tecido afetado pela caquexia seja o músculo esquelético, a caquexia não pode ser reduzida a uma síndrome de perda muscular. Na verdade, vários outros órgãos, como fígado, baço, coração, tecido adiposo e cérebro são afetados, tornando a caquexia uma verdadeira síndrome de múltiplos órgãos.

1.6. Caquexia do câncer: mais do que perda de músculo esquelético

Nas últimas décadas, os pesquisadores têm procurado os mediadores da caquexia do câncer na expectativa de desenvolver novas terapias para proteger contra a perda muscular esquelética. No entanto, a caquexia do câncer é cada vez mais vista como um fenômeno de natureza sistêmica. Metabolicamente, há uma complexa rede que envolve resistência aos sinais anabólicos, um estado catabólico geral e um balanço energético negativo (Porporato, 2016). Múltiplos mecanismos estão envolvidos no desenvolvimento da caquexia, englobando diversas alterações, variações fisiológicas e comportamentais, e como está frequentemente associada a uma doença crônica subjacente, sugere um crosstalk órgão-órgão desencadeando distúrbios em todo o corpo (Leitner et al., 2017) (Figura 6).

As manifestações clínicas na caquexia do câncer incluem efeitos em vários tecidos. Pacientes caquéticos, juntamente com a perda gradual de massa muscular, também manifestam uma série de doenças subjacentes, como inflamação sistêmica crônica (Dodson et al., 2011); inflamação do tecido adiposo (Tsoli et al., 2016); exacerbação metabólica do fígado (Narsale et al., 2015); comprometimento da função cardíaca (Kazemi-Bajestani et al., 2014); anorexia; esplenomegalia e hipermetabolismo (Evans et al., 2008). Curiosamente, enquanto na anorexia a perda de massa visceral ocorra proporcionalmente à perda de massa muscular, na caquexia, os órgãos viscerais, como coração, baço e fígado, mantêm massa ou podem até mesmo hipertrofiar (Tisdale, 2009).

Particularmente em pacientes com câncer de pâncreas enfrentam um risco nutricional elevado devido a fatores que vão além da caquexia ligada à doença. A modificação anatômica resultante do tumor se traduz em compressão extrínseca e obstrução mecânica do trato gastrointestinal, originando dor e desencadeando sintomas que interferem na ingestão e absorção de nutrientes, incluindo fadiga, disfagia, gastroparesia, insuficiência pancreática, má absorção e constipação (Poullia et al., 2020). Adicionalmente, a insuficiência pancreática induzida pelo câncer, resultando em distúrbios exócrinos (como esteatorreia) e endócrinos (como diabetes mellitus), pode desregular o balanço energético. Além disso, a cirurgia de ressecção do tumor na região da cabeça do pâncreas pode intensificar a insuficiência pancreática e reduzir a ingestão oral (Yoshida et al., 2015). Portanto, para fornecer uma definição clara dos determinantes moleculares e metabólicos da perda de tecido, é vital aplicar uma abordagem sistêmica na definição da contribuição de cada órgão individual para o processo caquético e compreender o papel do tumor neste processo e a interação entre os dois compartimentos.

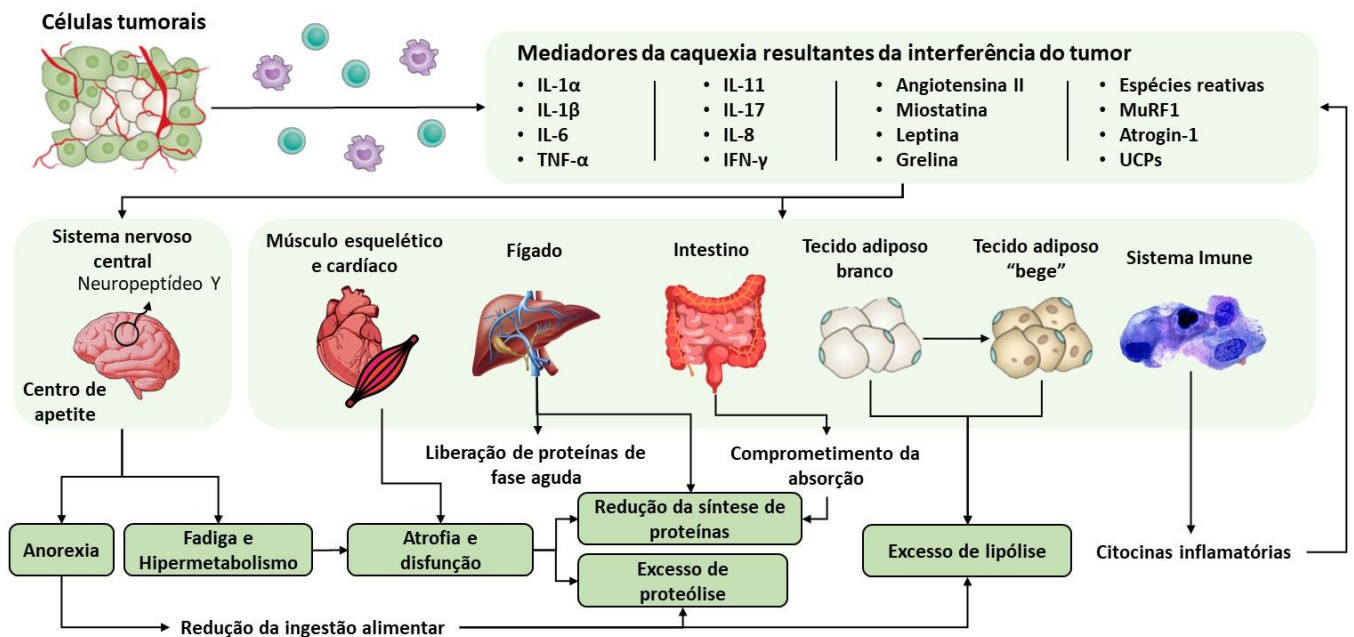


Figura 6: Representação esquemática dos múltiplos mecanismos envolvidos no desenvolvimento da caquexia. Na caquexia, múltiplos órgãos estão conectados através de diferentes mecanismos que contribuem para a progressão e manifestação da condição. Em linhas gerais, a inflamação crônica, as alterações hormonais e os distúrbios metabólicos contribuem para a progressão da síndrome, afetando diversos órgãos e sistemas do corpo. Adaptado de Baracos et al. (2018).

1.6.1. Atrofia do músculo esquelético e cardíaco

Independentemente da definição de caquexia, existe um consenso sobre a perda de massa muscular esquelética, com ou sem redução dos reservatórios de gordura corporal. O músculo esquelético é um tecido altamente plástico com a capacidade de adaptar sua estrutura e metabolismo em resposta a diferentes estímulos fisiológicos. O músculo esquelético é uma fonte de aminoácidos que podem ser liberados para produção de energia durante os processos catabólicos (Bonaldo et al., 2013). Em indivíduos saudáveis, a homeostase muscular é mantida por um equilíbrio entre os processos catabólicos e anabólicos no músculo esquelético, o que requer uma renovação constante das proteínas musculares para manter a massa muscular (Porporato et al., 2016). No entanto, quando ocorre degradação excessiva de proteínas e / ou diminuição da síntese de proteínas no músculo esquelético, o desequilíbrio pode causar perda muscular e levar à caquexia (Bonaldo et al., 2013). A

perda de músculo esquelético envolve várias alterações moleculares associadas a inflamação, metabolismo de proteínas, apoptose e diminuição da regeneração de tecidos (Argilés et al., 2014).

Como o músculo esquelético representa aproximadamente 40% do peso corporal, a perda de massa muscular está relacionada com importantes características clínicas em pacientes caquéticos, incluindo perda de peso, fraqueza e fadiga (Leitner et al., 2017). Embora alguns estudos relacionem a redução da síntese proteica no músculo esquelético à anorexia, essa diminuição também está presente em pacientes caquéticos sem anorexia, sugerindo um defeito subjacente na regulação da síntese proteica (Buijs et al., 2012). Da mesma forma, o aumento da quebra de proteínas resulta em perda muscular relacionada à caquexia. A degradação das proteínas musculares é iniciada por um conjunto de ubiquitina ligases específicas do músculo (E3), incluindo MuRF1 e Atrogin-1, que têm como alvo proteínas para degradação pelo proteossoma (Cao et al., 2005). A ativação desses constituintes acelera a ubiquitinação do substrato, aumenta a degradação proteica em proteossomos e potencializa a atrofia e perda do músculo esquelético, levando à caquexia do câncer. Particularmente, o estímulo da proteólise da musculatura esquelética pela ativação do UPS ocorre como resposta fisiológica desencadeada pela doença subjacente que mobiliza as citocinas pró-inflamatórias, como interleucinas e TNF- α (Argilés et al., 2009).

Uma nova descoberta em estudos com animais é que a disfunção e atrofia cardíaca são paralelas à atrofia do músculo esquelético na caquexia do câncer, porém, vale salientar que poucas pesquisas estão disponíveis sobre os efeitos da caquexia em órgãos vitais de pacientes humanos. As alterações cardíacas são típicas em pacientes com câncer (Argilés et al., 2014) e, em muitos casos, resultam em insuficiência cardíaca e arritmia, que são duas das causas concomitantes de morte durante a caquexia (Kalantar-Zadeh et al., 2013). No contexto do câncer, a insuficiência cardíaca é particularmente significativa porque a caquexia predispõe a insuficiência cardíaca e a insuficiência cardíaca resulta em caquexia e perda de massa muscular (Johns et al., 2014). Semelhante ao músculo esquelético, o catabolismo do músculo cardíaco na caquexia foi previamente relacionado à indução de autofagia e ativação do *turnover* de proteínas mediado pelo UPS (Willis et al., 2014), além de inflamação, proteólise e apoptose. Pesquisas em modelos animais relataram atrofia

cardíaca substancial em diferentes modelos de tumor indutores de caquexia (Kazemi-Bajestani et al., 2014). Além disso, a insuficiência cardíaca crônica foi previamente associada ao aumento do gasto energético em repouso (Mustafa et al., 2001), fornecendo outra razão para o aumento do gasto energético em pacientes caquéticos. Este aumento pode estar, pelo menos em parte, diretamente relacionado a um metabolismo aumentado do tecido cardíaco, uma vez que corações *ex vivo* de ratos com tumor apresentam uma taxa oxidativa aumentada (Drott et al., 1990).

1.6.2. Fígado

Uma das principais funções do fígado é atuar como uma fábrica biológica. Mais especificamente, o fígado rege a taxa metabólica sistêmica, regulando as vias envolvidas na utilização, transporte, armazenamento e quebra de glicose e gordura (Narsale et al., 2015). Ele produz a maioria dos compostos exigidos pelos organismos, incluindo glicose, aminoácidos, ácidos graxos, colesterol e hormônios que regulam várias funções complexas, como, IGF-1 (fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1), angiotensinogênio (pressão arterial) e vários fatores da cascata da coagulação (Porporato et al., 2016). Em adição, também é conhecido por produzir as proteínas de fase aguda (PFA) em resposta a estímulos inflamatórios que podem levar à degradação do músculo em aminoácidos (Bonetto et al., 2011).

O fígado é um órgão central no gerenciamento do metabolismo sistêmico. No entanto, a natureza e a extensão dos danos ao fígado durante a caquexia do câncer são ainda pouco exploradas. As demandas energéticas do fígado são particularmente substanciais. O fígado representa cerca de 2% do peso corporal total em indivíduos saudáveis, contudo é um órgão caracterizado por alta taxa metabólica contribuindo em aproximadamente 20% do gasto energético em repouso (GER) (Liefers et al., 2009). A massa do órgão tem sido usada para modelar e prever o GER (Gallagher et al., 1998), e o tamanho do fígado é um preditor significativo da taxa metabólica em repouso (Illner et al., 2000). Um pequeno aumento na massa do fígado tem o potencial de ser responsável por um acréscimo substancial de gasto de energia em repouso ao longo do tempo (Liefers et al., 2009).

Embora negligenciada (em comparação com músculo e gordura), a massa do fígado aumenta substancialmente durante a progressão da caquexia (Liefers et al., 2009), sugerindo fortemente o envolvimento desse órgão na caquexia do câncer. Especula-se que tanto a hepatomegalia quanto a esplenomegalia (aumento do baço) poderiam aumentar a perda muscular indiretamente, competindo por aminoácidos, ácidos graxos e outros substratos. A hepatomegalia provavelmente também representa a proliferação de hepatócitos (diferente do aumento do tamanho do órgão devido a tumores hepáticos ou metástases) (Zimmers et al., 2016). Em modelos animais, o aumento da massa hepática é observado na caquexia induzida por carcinoma pulmonar de Lewis (LLC) e adenocarcinoma do cólon (C26) (Bonetto et al., 2011). Em ratos com tumores hepáticos, hepatomegalia é observada na caquexia inicial, seguida por apoptose de hepatócitos e redução da massa hepática em direção à morte (Tessitore et al., 1987; Finnerty et al., 2009). Da mesma maneira, a administração sistêmica de IL-6 em camundongos portadores de tumores de células epiteliais derivadas do ovário resulta em hepatomegalia e hiperplasia de hepatócitos (Zimmers et al., 2003). Em contrapartida, ao estabelecer e caracterizar os efeitos caquéticos associados ao crescimento do câncer de ovário humano em camundongos, notavelmente constatou-se a redução da massa hepática e preservação do baço (Pin et al., 2018). Portanto, é difícil ser definitivo sobre a extensão em que ocorre o crescimento do fígado na caquexia do câncer humano. No entanto, todas essas condições compartilham altos níveis de IL-6, e a administração de IL-6 sozinha é suficiente para conduzir a proliferação de hepatócitos, hipertrofia hepática maciça e a resposta de fase aguda (Zimmers et al., 2003).

1.6.3. Baço

A relação entre o baço e a caquexia pode ser compreendida por meio do envolvimento do sistema imunológico e dos processos inflamatórios. O baço é um órgão importante do sistema imunológico localizado no lado superior esquerdo do abdômen. Ele desempenha um papel crucial na filtração do sangue, removendo glóbulos vermelhos velhos ou danificados e produzindo células imunológicas, como

linfócitos (Bronte et al., 2013). No contexto da caquexia, o baço pode contribuir para o desenvolvimento ou progressão da caquexia por meio de vários mecanismos:

1. **Inflamação:** O baço é um participante ativo na resposta imunológica e pode amplificar os processos inflamatórios. Citocinas inflamatórias e outros fatores imunológicos liberados durante a inflamação crônica podem induzir a perda de massa muscular e a falta de apetite, contribuindo para a caquexia (Argiles et al., 2012).

2. **Aumento do gasto energético:** A caquexia é caracterizada por um aumento do gasto energético em repouso (GER) ou taxa metabólica. O baço, como um órgão metabolicamente ativo, pode contribuir para a elevação do GER. Da mesma forma, processos inflamatórios e ativação imunológica no baço podem levar a um aumento das demandas energéticas, desviando energia das reservas musculares e de gordura e contribuindo para a perda de peso (Westerberp et al., 2017).

3. **Alterações na função imunológica:** O baço desempenha um papel vital na função imunológica, e alterações em sua estrutura e função podem afetar a resposta imunológica. Na caquexia, a desregulação das células imunológicas e seus fatores secretados podem perturbar o equilíbrio normal entre processos pró-inflamatórios e anti-inflamatórios. Essa desregulação pode contribuir para a perda de massa muscular e a falta de apetite observadas na caquexia (Fearon et al., 2011).

4. **Esplenomegalia:** Em certas condições, como câncer avançado ou doença hepática, o baço pode aumentar de tamanho (esplenomegalia). Em geral, a esplenomegalia é uma manifestação de hiperfunção, incluindo hiperplasia imune, hematopoiese extramedular (mecanismo compensatório que ocorre para suprir a demanda corporal de células sanguíneas) e remoção de hemácias defeituosas (Song et al., 2018). No entanto, o aumento do baço também pode refletir em sintomas debilitantes, como saciedade precoce, hipertensão, diminuição da atividade física, além de obstrução venosa e câncer metastático (Mesa et al., 2006). A esplenomegalia é observada em alguns modelos animais de caquexia (Aulino et al., 2010; Piegari et al., 2011). Adicionalmente, observou-se que a presença do tumor LLC em camundongos induziu a expressão sistêmica de citocinas pró-caquéticas pelo baço, e que essa indução acelerou o início da caquexia (Barton et al., 2001). A esplenomegalia pode ser uma consequência de processos de doença subjacentes ou um efeito direto

da caquexia. O aumento do tamanho do baço pode agravar ainda mais as alterações metabólicas e inflamatórias associadas à caquexia.

1.6.4. Metabolismo energético

A abordagem clínica das anormalidades do peso corporal humano durante o câncer é enquadrada no conceito de balanço energético. O gasto energético total é dividido em gasto energético de repouso, gasto energético induzido pela dieta e gasto energético da atividade física (Fearon et al. 2012). O gasto energético de repouso (GER) aparece como a alteração mais comum em pacientes com câncer em comparação com indivíduos saudáveis. O GER representa aproximadamente 70% do gasto energético total, a atividade física voluntária em torno de 25%, e outros 5% provenientes do efeito térmico dos alimentos (Bennani-Baiti et al., 2011). A maioria dos pacientes com câncer diminui significativamente sua atividade física e ingestão de alimento, devido às terapias antitumorais e às comorbidades que as acompanham. No entanto, cerca de 50% dos pacientes com câncer são considerados hipermetabólicos (GER > 110% do esperado) (Westerterp et al., 2017), especialmente pacientes com câncer de pâncreas e pulmão (Falconer et al., 1994). A desregulação dos processos metabólicos e do gasto de energia resulta na perda de peso associada ao câncer, e para alcançar a preservação do peso ou reverter a perda, se faz necessário a compreensão dos mecanismos periféricos de manutenção da energia do corpo e do tumor.

Durante a progressão do câncer, uma série de eventos observados dentro do tumor, como inflamação e reprogramação metabólica, também ocorrem sistemicamente. Tumores humanos são conhecidos por induzir uma resposta catabólica no hospedeiro para fornecer nutrientes para o metabolismo anabólico do tumor e a progressão do câncer (Figura 7). Esse aumento significativo na exploração de energia pelo câncer pode ser explicado pelo efeito Warburg. O efeito Warburg, em homenagem ao seu descobridor Otto Warburg, refere-se à observação de que células tumorais, mesmo na presença de oxigênio adequado, utilizam mais glicose e produzem mais lactato do que as células normais circundantes, um processo que eles

denominaram de “glicólise aeróbica” (Warburg, 1956). Para obter energia suficiente pela glicólise, as células cancerosas superexpressam os principais reguladores da glicólise, como os transportadores de glicose e as enzimas glicolíticas, e usam preferencialmente a glicólise aeróbica como fonte de energia em vez da via mitocondrial. Embora a glicólise aeróbica seja 90% menos eficiente que a fosforilação oxidativa mitocondrial na produção de ATP, ela é 10-100 vezes mais rápida (Wilson et al., 2019). Mais tarde no processo, o gasto energético leva ao desperdício, pois os tecidos tumorais retiram energia do corpo por metabolizar aproximadamente dez vezes mais glicose e, entretanto, produzem lactato como resíduo (Koppenol et al., 2011). No fígado, o lactato é reciclado em glicose através da gliconeogênese a custo de energia. Quando a glicose é liberada na circulação, a célula cancerosa pode levá-la para glicólise novamente. Essa via glicose-lactato-glicose é chamada de ciclo de Cori, que aumenta o gasto de energia e a gliconeogênese hepática (Waterhouse et al., 1969). Conseqüentemente, o músculo esquelético passa por metabolismos catabólicos para mobilizar mais precursores de glicose para a gliconeogênese (Wang et al., 2018). Quando essas condições persistem, o peso corporal diminui. Sob essa luz, o efeito Warburg em células cancerosas tem sido associado à indução da caquexia do câncer. De acordo com essa hipótese, quando células de câncer pancreático humano foram transplantadas em camundongos em crescimento, os camundongos mostraram ganho de peso corporal reduzido se comparados com o grupo controle, e quando o gene HIF-1 α foi silenciado para inibir o efeito Warburg nas células cancerosas, o peso corporal do grupo portador de tumor foi melhorado (Wang et al., 2007). A ativação do HIF-1 α tem sido relacionada à angiogênese, eritropoiese e modulação de enzimas envolvidas na glicólise aeróbica, modulando assim os processos-chave necessários para o efeito Warburg (Courtney et al., 2015).

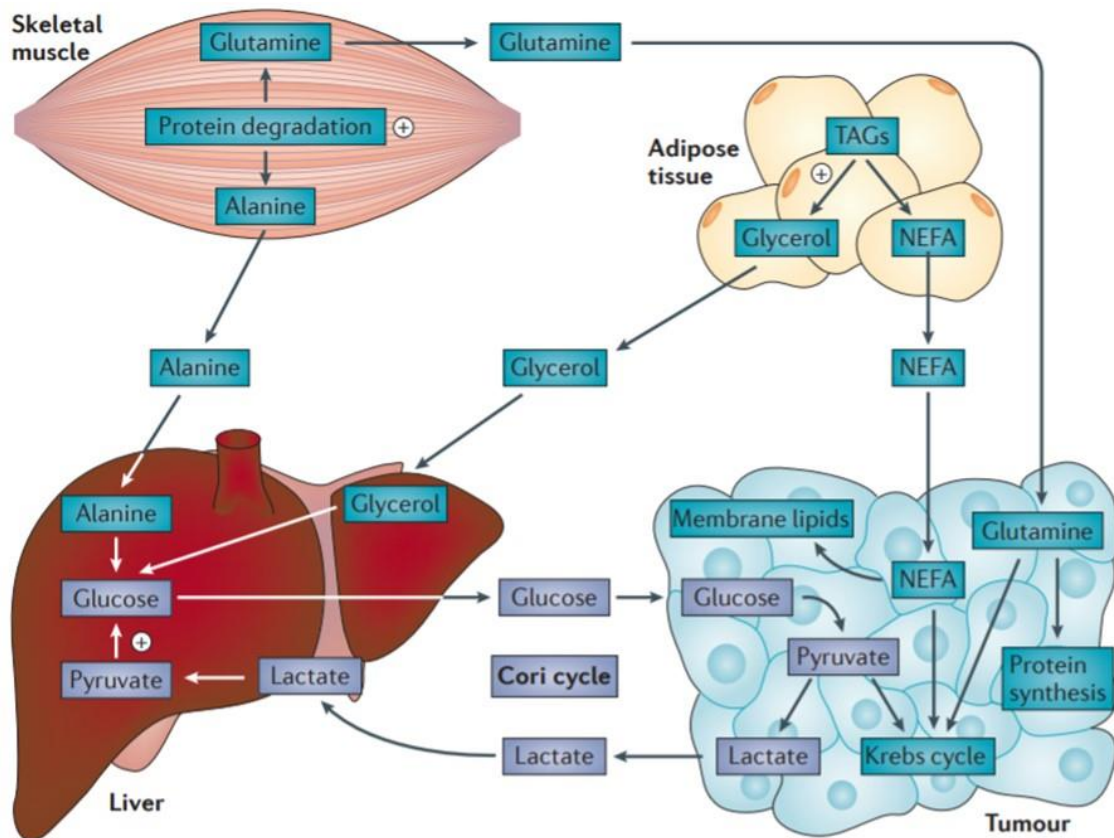


Figura 7: Principais adaptações metabólicas associadas à carga tumoral. O metabolismo do corpo passa por diversas mudanças para atender às necessidades energéticas do tumor. Essas alterações visam fornecer nutrientes e energia para o crescimento e proliferação das células cancerígenas. Algumas das principais mudanças metabólicas incluem o aumento da captação da glicose, alterações no metabolismo lipídico e degradação aumentada de proteínas. Essas alterações metabólicas permitem que as células cancerígenas obtenham os nutrientes e a energia necessários para o seu crescimento contínuo, mesmo às custas do metabolismo normal do corpo. Fonte: Argilés et al. (2014)

Durante o crescimento do tumor, o tecido hepático é ativamente recrutado a realizar a gliconeogênese de alta taxa, usando o lactato derivado da glicólise tumoral. No entanto, o papel do lactato vai muito além de ser apenas uma fonte de energia. O lactato é uma molécula de sinalização que estimula a angiogênese tumoral, promovendo a inflamação e inibindo as respostas imunes adaptativas (Doherty et al., 2013). Devido a essas características, o lactato tem sido associado à ocorrência de focos metastáticos em modelos animais, sendo um marcador de mau prognóstico em pacientes (Bonuccelli et al., 2010; Doherty et al., 2013). O fígado também pode usar outras fontes para a gliconeogênese no Ciclo Oncogênico do Cori, como o glicerol

(liberado pela hidrólise de triglicerídeos no tecido adiposo) e os aminoácidos (formados pela quebra de proteínas miofibrilares no músculo esquelético) (Tisdale, 2009). Em conjunto, a exacerbação desses ciclos contribui não apenas para a patogênese da caquexia, mas também para o crescimento tumoral e metástase, representando até 40% do gasto de energia em pacientes com câncer metastático (Fearon et al., 2012).

Um mecanismo alternativo que pode contribuir para o hipermetabolismo é o aumento da expressão de proteínas desacopladoras mitocondriais (UCPs). Existem três UCPs: UCP1, proteína mitocondrial expressa principalmente no tecido adiposo marrom (TAM); UCP2, amplamente expressa na maioria dos tecidos, incluindo gordura branca, TAM, músculo, coração e fígado; e UCP3, principalmente confinada a tecidos termogênicos, como músculo esquelético e gordura marrom em roedores; em humanos, é predominantemente expresso no músculo (Qualliotine-Mann et al., 1993).

Os UCPs são portadores de ânions mitocondriais da membrana interna que desempenham papel termogênico e exercem efeitos importantes na oxidação de ácidos graxos mitocondriais e na prevenção de danos oxidativos induzidos por ROS mitocondriais (Busiello et al., 2015). Mais especificamente, a expressão de UCP1 na mitocôndria do tecido adiposo marrom, onde representa aproximadamente 10% do conteúdo de proteína mitocondrial, promove o vazamento de prótons através da membrana mitocondrial interna, reduzindo o gradiente de prótons, de modo que o consumo de oxigênio não é mais acoplado à síntese de ATP e calor é gerado (Austin et al., 2012). Já as expressões de UCP2 e UCP3 foram propostas como um meio celular para prevenir o estresse oxidativo excessivo pela inibição do sistema de fosforilação oxidativa (Nedergaard et al., 2005).

Dada a sua função, tais proteínas foram associadas a um fenótipo magro em camundongos transgênicos (Busiello et al., 2015). Enquanto o nível de mRNA de UCP1 foi observado estar aumentado no TAM de camundongos caquéticos com câncer (Bing et al., 2008), o gene *UCP2* foi superexpresso no músculo esquelético de ratos caquéticos (Julienne et al., 2012), e os níveis de mRNA de UCP3 foram mais de cinco vezes maiores nos músculos esqueléticos de pacientes com câncer caquético em comparação com os controles (Bing et al., 2008). Curiosamente, um modelo de

camundongo transgênico superexpressando a proteína UCP3 no músculo esquelético exibiu um fenótipo magro e até mesmo apresentou comportamento hiperfágico, com aumento de 50% na ingestão de alimentos em comparação com controles não transgênicos (Clapham et al., 2000). À vista disso, quer as alterações nos níveis de UCPs causem ativamente o desgaste ou tentem evitá-lo, o aumento resultante do vazamento de prótons pode ser responsável pela ineficiência energética típica da caquexia, contribuindo para o aumento do gasto energético em repouso evidente em pacientes caquéticos (Giordano et al., 2003) (Figura 8).

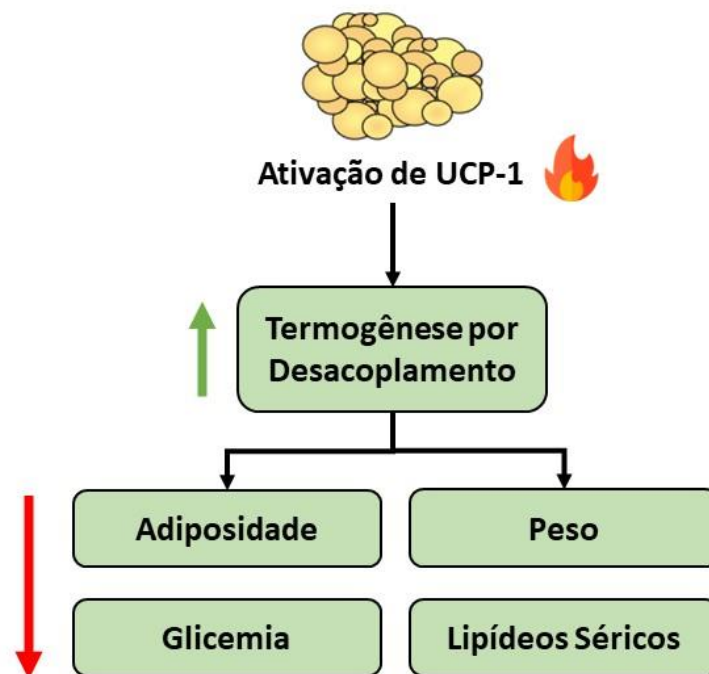


Figura 8: Envolvimento da ativação de UCP-1 na caquexia do câncer. Durante a caquexia, ocorre um aumento na expressão e atividade da UCP1 em tecidos adiposos, incluindo o tecido adiposo marrom e branco, promovendo a termogênese. A termogênese induzida pela UCP1 resulta em uma maior dissipação de energia na forma de calor, em vez de ser armazenada como gordura, levando à redução da massa de tecido adiposo e à perda de peso observada nos pacientes caquéticos. Além disso, o aumento da termogênese pode contribuir para o aumento do gasto energético e desequilíbrio metabólico característicos da condição.

1.6.5. Cérebro e anorexia

A síndrome de anorexia-caquexia é um processo metabólico complexo frequentemente vivenciado por pacientes em estágios avançados de doença crônica. Acredita-se que as citocinas implicadas no desenvolvimento da caquexia, incluindo TNF- α , IL-1 e IL-6, também contribuam para o desenvolvimento da anorexia por meio da modulação das vias de sinalização que medeiam o equilíbrio entre estimular e inibir a ingestão de alimentos. Relatos de pacientes com câncer e com evidência de inflamação sistêmica apresentam ingestão alimentar reduzida (Wigmore et al., 1997), sugerindo um possível papel das citocinas pró-inflamatórias na supressão do apetite. Apesar dos sinais periféricos que desencadeiam a ingestão de alimentos serem mantidos em algumas condições caquéticas, tem sido observada uma diminuição da responsividade do hipotálamo, impedindo uma resposta adequada para aumentar a ingestão de alimentos (Ramos et al., 2004). Portanto, pacientes com câncer de pâncreas frequentemente experimentam diminuição da ingestão de alimentos, além de caquexia, levando à perda de massa corporal. Os fatores subjacentes que contribuem para a redução da ingestão de alimentos incluem diminuição do impulso central para comer, distúrbios quimiossensoriais (por exemplo, no paladar e no olfato) e diminuição da motilidade gastrointestinal superior (por exemplo, saciedade precoce e náusea) (Fearon et al., 2011).

O papel da anorexia e da redução da ingestão alimentar varia entre os modelos animais de caquexia. Em resumo, os modelos animais de anorexia do câncer diferem no tipo de tumor, características (padrão de crescimento e extensão) e grau de atrofia. Em alguns, há pouca evidência de redução na ingestão de alimentos, enquanto em outros é um problema importante e aumenta com a progressão do tumor / caquexia (Bennani-Baiti e Walsh, 2011). Os resultados desses estudos são difíceis de comparar e interpretar coletivamente, pelo menos em parte devido à grande diversidade de modelos de tumor. Além disso, o estágio de progressão do tumor no momento do estudo e sua desnutrição associada são extremamente variáveis entre os estudos. Em muitos modelos de tumor, a carga tumoral excessiva (entre 1 a 30% do peso corporal total) exerce efeito sobre o estado nutricional do hospedeiro, simplesmente devido à sua elevada massa e capacidade de capturar nutrientes (Baracos et al.,

2000). Este estágio não é representativo de tumores humanos que geralmente não excedem 1% do peso corporal (Bennani-Baiti e Walsh, 2011). Desse modo, o estado nutricional do hospedeiro deve ser cuidadosamente definido nas condições experimentais analisadas.

Grande parte da literatura recente sobre os mecanismos cerebrais que controlam o apetite centrou-se no neuropeptídeo Y (NPY), um peptídeo de 36 aminoácidos que é amplamente distribuído por todo o sistema nervoso central (Shende et al., 2020). O NPY é um dos neurotransmissores mais abundantes e extensivamente distribuídos no cérebro de mamíferos, sendo expresso por uma infinidade de sistemas neuronais em regiões que vão desde o tronco cerebral medular até o córtex cerebral (Sajdyk et al., 2004). Esse peptídeo tem demonstrado produzir diversos efeitos sobre várias funções fisiológicas, como homeostase energética (Chambers et al., 2021), resposta ao estresse (Hirsch et al., 2021), fisiologia óssea (Lee et al., 2009), neurogênese (Malva et al., 2021) e regulação de células imunes (Dimitrijevic et al., 2013), contudo, seu efeito mais notável está associado ao comportamento alimentar.

O NPY é considerado um sensor e regulador do balanço energético, modulando a ingestão alimentar em situações de carência energética, o que é corroborado pelos achados de que o NPY é regulado positivamente em condições de balanço energético negativo ou aumento da demanda metabólica como restrição alimentar, privação alimentar e exercício (Dwarkasing et al., 2015). Em condições fisiológicas, o NPY produz uma mudança para o balanço energético positivo aumentando a ingestão de alimentos, diminuindo o gasto de energia, principalmente por reduzir a termogênese no tecido adiposo marrom e facilitar a deposição de gordura no tecido adiposo branco parcialmente através do aumento da atividade da insulina (Nilsson et al., 2013). Estima-se que o efeito estimulador da alimentação do NPY seja cerca de 500 vezes mais potente em uma base molar do que a norepinefrina, um neurotransmissor aminérgico (Inui, 2000). Injeções múltiplas de NPY no núcleo paraventricular ou no ventrículo cerebral resultam em obesidade, indicando que o NPY é capaz de anular poderosos sinais inibitórios na ingestão de alimentos e adiposidade corporal (Patra et al., 2012). Devido à sua ação fisiológica, a via NPYérgica é frequentemente implicada como uma das vias neurais hipotalâmicas cuja atividade é alterada em caquexia do

câncer, embora seu papel exato no desenvolvimento da perda de peso corporal induzida pelo tumor ainda não tenha sido elucidado.

Relatos anteriores mostraram que camundongos com tuberculose caquética, o RNA mensageiro do NPY no hipotálamo está elevado (Chance et al., 2007; Nara-ashizawa et al., 2001) e que essa elevação do mRNA NPY não reflete o comportamento da ingestão alimentar. Por outro lado, roedores portadores de um tumor de melanoma humano (A375) que não desenvolvem caquexia e perda de peso não apresentaram essa elevação do mRNA do NPY (Nara-ashizawa et al., 2001), sugerindo que a caquexia pode ser um importante gatilho na estimulação do mRNA de NPY. Dwarkasing et al. (2015) demonstraram que a expressão gênica de NPY está aumentada tanto em camundongos com tumores induzidos por células de carcinoma de pulmão de Lewis (LLC) quanto em modelos de adenocarcinoma de cólon (C26) e este estava entre os genes mais fortemente induzidos em ambos os modelos. Curiosamente, esses dois modelos compartilhavam características comuns de perda de massa muscular e perda de gordura, enquanto exibiam efeitos opostos no comportamento de ingestão de alimentos. Constatou-se que os camundongos portadores do tumor C26 aumentaram sua ingestão de alimentos de forma síncrona com a perda de peso corporal, enquanto os camundongos portadores do LLC mostraram ingestão alimentar reduzida após o xenoenxerto do tumor em comparação com o grupo controle. Isso sugere que a expressão de NPY em camundongos caquéticos é independente do status de ingestão de alimentos e que outros sinais orexígenos e/ou anorexígenos podem estar envolvidos na caquexia. Adicionalmente, a expressão do gene NPY é geralmente inalterada ou aumentada em modelos experimentais de inflamação crônica. Em um modelo de artrite adjuvante em ratos (semelhante à artrite reumatóide humana), os níveis de mRNA de NPY foram elevados apesar da redução da ingestão de alimentos, massa corporal e estoques de estoques de gordura epididimal em comparação com animais de controle (Stofkova et al., 2009). Em contrapartida, ainda que diversos estudos na literatura tenham investigado os níveis de NPY em animais, são poucos os que avaliam esse neuropeptídeo em pacientes humanos com câncer caquético. Um estudo recente (Bilir et al., 2015) mostrou que os níveis séricos de NPY foram significativamente diminuídos em 46 pacientes com caquexia do câncer, mas essa queda não foi significativa nos pacientes com caquexia refratária. Ao avaliar 23 crianças

diagnosticadas com câncer, constatou-se que os níveis de NPY diminuíram significativamente durante a quimioterapia (Caglar et al., 2005). Em outro estudo incluindo pacientes com câncer não caquético, os níveis séricos de NPY não mudaram significativamente após a quimioterapia do câncer (Kowalczyk et al., 2001). Por fim, embora algum grau de disfunção no sistema NPY provavelmente ocorra em humanos caquéticos, a caquexia não parece ser um estado de deficiência de NPY e, portanto, é improvável que a reposição de NPY previna ou reverta a caquexia em um ambiente clínico.

1.6.6. Deficiências funcionais

A avaliação do status de desempenho em pacientes com câncer é uma ferramenta de prognóstico para a sobrevida global (Buccheri et al., 1996). A pontuação do status de desempenho é, na verdade, uma medida do declínio do funcionamento físico que ocorre como uma parte inevitável da síndrome de caquexia. Pacientes com caquexia do câncer exibem deficiências funcionais, incluindo redução na força e mobilidade do corpo (Dahele et al., 2007), além de fadiga severa (Ahlberg et al., 2003). Especificamente, a perda da função dos músculos dos membros prejudica a independência funcional e a perda da função do diafragma está implicada na insuficiência respiratória (Murphy et al., 2011). Pacientes que sofrem de caquexia do câncer têm mobilidade reduzida e níveis de atividade física, dando até 43% menos passos por dia em comparação com controles saudáveis (Dahele et al., 2007; Fouladiun et al., 2007). Além de reduzir a independência funcional, a redução nos níveis de atividade física é positivamente correlacionada com a perda de peso (Fouladiun et al., 2007).

Apesar do principal resultado da caquexia do câncer que afeta a qualidade de vida e mortalidade do paciente ser o desgaste do músculo esquelético, muitos estudos de modelagem animal não recapitulam o definhamento funcional como desfecho primário, e os ensaios clínicos são realizados sem esta informação crucial (Murphy et al., 2009). Embora os modelos animais de caquexia imitem de perto a condição metabólica, é imperativo que esses modelos também recapitem a perda de força

muscular, redução dos níveis de atividade física e aumento da fadiga muscular para serem adequadamente representativos do quadro clínico.

1.7. Modelagem pré-clínica: a importância dos xenotransplantes

O uso de modelos pré-clínicos que imitam de perto a biologia do câncer em pacientes é crucial para a pesquisa translacional do câncer e a medicina de precisão, desde prever com confiabilidade os aspectos biológicos da doença até estabelecer de novos candidatos a medicamentos (Okada et al., 2018). Tais modelos são capazes de produzir resultados de testes de drogas em um curto espaço de tempo para direcionar a terapia imediata do câncer (Biondi et al., 2015; Chan et al., 2016; Nagasaka et al., 2018; Vreeland et al., 2018). Ainda que os ensaios pré-clínicos sejam bem-sucedidos, menos de 10% dos medicamentos propostos são aprovados para o mercado (Alteri et al., 2018). Já para medicamentos oncológicos, esse número está em aproximadamente 5% (DiMasi et al., 2013). Uma possível razão é a falta de modelos pré-clínicos apropriados de câncer humano.

Ainda que os ensaios *in vitro* sejam úteis na determinação do mecanismo biológico e na otimização dos parâmetros experimentais, a tradução dos resultados *in vitro* para a clínica é geralmente difícil. A experimentação animal é uma aproximação melhor do que os testes *in vitro*, e o uso de modelos animais para estudar o tratamento do câncer é essencial para extrapolar os resultados experimentais e responder as perguntas relacionadas ao método mais eficaz para tratar seres humanos. Ao selecionar um modelo animal deve-se considerar a disponibilidade do animal, custo, facilidade de manuseio e cuidados, tamanho do animal, aceitação pela sociedade, resistência à cirurgia, infecção, doença e propriedades biológicas análogas aos seres humanos (Bigham-Sadegh et al., 2015).

Entre os mais importantes e desafiadores estão os modelos de camundongos, que precisam representar os diferentes estágios da doença, a população de pacientes e a referência saudável (Ibarrola-Villava et al., 2019). No início dos anos 60, os primeiros camundongos imunocomprometidos conhecidos foram descobertos pelo Dr. Noman Grist (Ruchill Hospital, Glasgow, Reino Unido) (Flanagan, 1966). Grist

observou que alguns camundongos adquiriram espontaneamente uma mutação que levou à ausência de timo, deficiência imunológica e ausência de pelos (“nus”) (Okada et al., 2019). Anos mais tarde, demonstrou-se que camundongos nus abrigam uma mutação no gene *Foxn1* (Schorpp et al., 1997), que codifica um fator de transcrição essencial para a função epitelial do timo; resultando em crescimento anormal de pêlos e um bloqueio no desenvolvimento de células T devido a deterioração no estroma tímico (Nehls et al., 1994). A deficiência de linfócitos T imunocomprometem os camundongos e permite o enxerto, o crescimento e a metastização das células tumorais após a implantação (Stakleff e Von Gruenigen, 2003; Sun et al., 2014). No entanto, camundongos imunocompetentes ainda abrigam diversas camadas de defesa imunológica que limita as opções para o transplante de câncer humano; estes incluem mecanismos inatos (mediados por complemento, macrófagos e neutrófilos), bem como respostas imunes adaptativas (rejeição mediada por anticorpos) (Li et al., 2019). Além disso, camundongos nus mostram vazamento de células T com a idade (Giovannella et al., 1985).

Apesar disso, camundongos nus têm sido utilizados como receptores para o transplante de células tumorais humanas, evoluindo desde camundongos transplantados com derivados de linhagem celular até camundongos geneticamente modificados e modelos de xenoenxerto de tecidos (Sharma et al., 2010; Suggit et al., 2005). Os modelos mais comumente usados são gerados pela injeção subcutânea de linhagens celulares cultivadas *in vitro* a partir de tumores humanos em hospedeiros imunodeficientes (van Weerden et al., 2000). Os implantes realizados a partir de linhas celulares estabelecidas são chamados de “indiretos”, devido a longos períodos de crescimento *in vitro* de células cancerosas (geralmente décadas) desde a aquisição de pacientes e a implantação em animais, e podem sofrer implante ortotópico ou heterotópico (Figura 9A). Os modelos ortotópicos são tecnicamente mais desafiadores e demorados. Este método envolve a implantação direta no órgão do camundongo receptor. Em alguns casos, podem ser necessários estudos adicionais por imagem para verificar a localização dos enxertos tumorais durante e após o implante (Siolas et al., 2013). Já os modelos heterotópicos envolvem a implantação de células tumorais no flanco subcutâneo do camundongo (Kim et al., 2009). Este modelo é simples de gerar e mostra crescimento consistente de tumores entre animais, e como o crescimento muito rápido é a principal marca registrada das linhagens celulares,

apresentam um forte histórico de uso em pesquisas que têm como alvo preferencial a proliferação (Cree et al., 2010). Os modelos de enxerto de linhagem celular são frequentemente usados para entender a genética do câncer e os mecanismos de resistência a medicamentos, além de permitir a validação do conceito *in vivo* nos estágios relativamente iniciais do desenvolvimento da droga. A popularidade desses modelos se deve à alta disponibilidade, aos custos reduzidos em comparação aos outros modelos e às altas taxas de obtenção (Whittle et al., 2015).

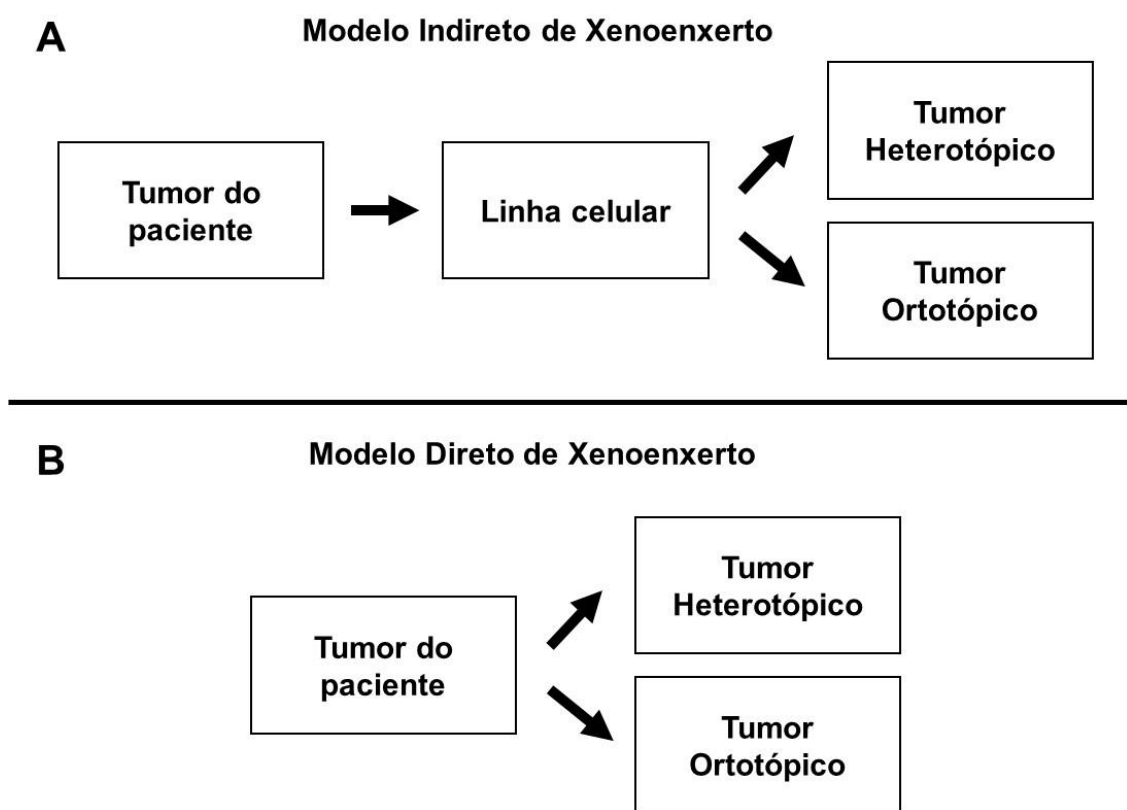


Figura 9: Comparação de modelos de xenoenxertos atuais. (A) Xenoenxertos indiretos são criados a partir de linhas celulares estabelecidas e podem sofrer implantação heterotópica ou ortotópica. **(B)** Xenoenxertos diretos são criados a partir de fragmentos tumorais de pacientes originais sem um intermediário de linha celular. Adaptado de Kim et al. (2009).

Embora sejam adequados para pesquisas moleculares e genéticas, bem como para análises bioquímicas e mecanicistas, as diferenças marcantes entre o ambiente de cultura celular *in vitro* e o ambiente de tumor *in vivo* levantam preocupações de que elas podem não ser totalmente representativas dos tumores humanos (Ben-David et

al., 2017). Dentro dos tumores, as células tumorais são normalmente capazes de crescerem com reduzida ligação ao substrato (geralmente proteínas da membrana basal) e a outras células. Por outro lado, ao adaptar as linhagens celulares para crescer no meio de cultura celular, o que proporciona um microambiente muito diferente daquele que elas experimentaram no tumor nativo, estas podem se tornar dependentes de fatores de crescimento fornecidos, como soro ou outros suplementos, e frascos que incentivam a aderência celular (Fernando et al., 2006). Além disso, a maioria das linhagens celulares tendem a perder as características heterogêneas dos tumores originais pela pressão seletiva na cultura de células *in vitro* (Khaled et al., 2014), e assim ineficientemente representam a heterogeneidade intratumoral e o amplo espectro mutacional existente na doença (Radloff et al., 2008; Cree et al., 2010). Infelizmente, a cultura de longo prazo tende a se refletir em maior instabilidade genética e importantes alterações fenotípicas, convertendo-as em entidades distintas do tumor original e destituídas de significância clínica (Radloff et al., 2008; Cree et al., 2010). Outra preocupação com o uso de populações homogêneas de células em linhagens celulares é baixa proporção de células correspondentes a células-tronco cancerosas (células iniciadoras de tumor). Tais células *in vivo* são resistentes a muitos medicamentos e provavelmente são responsáveis pela reincidência do câncer após o tratamento aparentemente bem-sucedido. Em alguns casos, a alteração desse fenótipo pode ser viável, porém, outras estratégias terapêuticas podem exigir drogas que atuem em diferentes alvos (Wurdak et al., 2010). Contudo, vale salientar que a realização de ensaios de formação de tumor, com base na propriedade única das células-tronco de sobreviver e crescer em cultura em suspensão, são aplicados com sucesso para enriquecer células-tronco de amostras de linhagens de células cancerosas (Pizon et al., 2016). Foi relatado que as tumoresferas superexpressam fatores neoangiogênicos e citoprotetores, além de genes de pluripotência (Liu et al., 2013; Ponti et al., 2005). Por fim, o desenvolvimento de modelos de pesquisa que representem melhor a substancial heterogeneidade e complexidade biológica dos tumores humanos se coloca como um passo essencial para avançar a oncologia de precisão.

Em resposta a estas e outras preocupações, a modelagem através de enxerto direto de tecido tumoral humano em camundongos imunodeficientes têm recebido interesse crescente. Tais modelos diretos de xenoenxerto, gerados diretamente a

partir de amostras de tumores de pacientes sem linhagem intermediária (Figura 9B), foram denominados como “modelos de xenoenxerto derivado de paciente” (PDX, *patient-derived xenograft*) (Van Cutsem et al., 2004). Embora os tumores variem na gravidade de seus sintomas e nas espécies que podem ser usadas para um modelo específico de câncer, os modelos mais frequentemente utilizados empregam um protocolo básico semelhante para a geração de xenotransplantes (Figura 10). Após o paciente ser submetido a ressecção cirúrgica ou outros procedimentos médicos, uma parte do tumor da cirurgia é inserido no meio de preservação e o tumor é seccionado em pequenos fragmentos. Os fragmentos frescos são implantados por via subcutânea (transplante heterotópico) ou diretamente no órgão (transplante ortotópico) de animais receptores. A primeira geração de camundongos que recebem os fragmentos de tumor do paciente é frequentemente designada F0. Os tumores que se desenvolvem com sucesso são dissecados e reimplantados várias vezes para gerar grandes linhagens de camundongos portadores de tumores. Cada geração a seguir é designada F1, F2, F3, ... e Fn (Jung et al., 2018). Para estudos de desenvolvimento de drogas, o PDX é frequentemente usado a partir da geração F3, após garantir que o PDX não tenha divergência genética ou histológica do tumor original (Tentler et al., 2012).

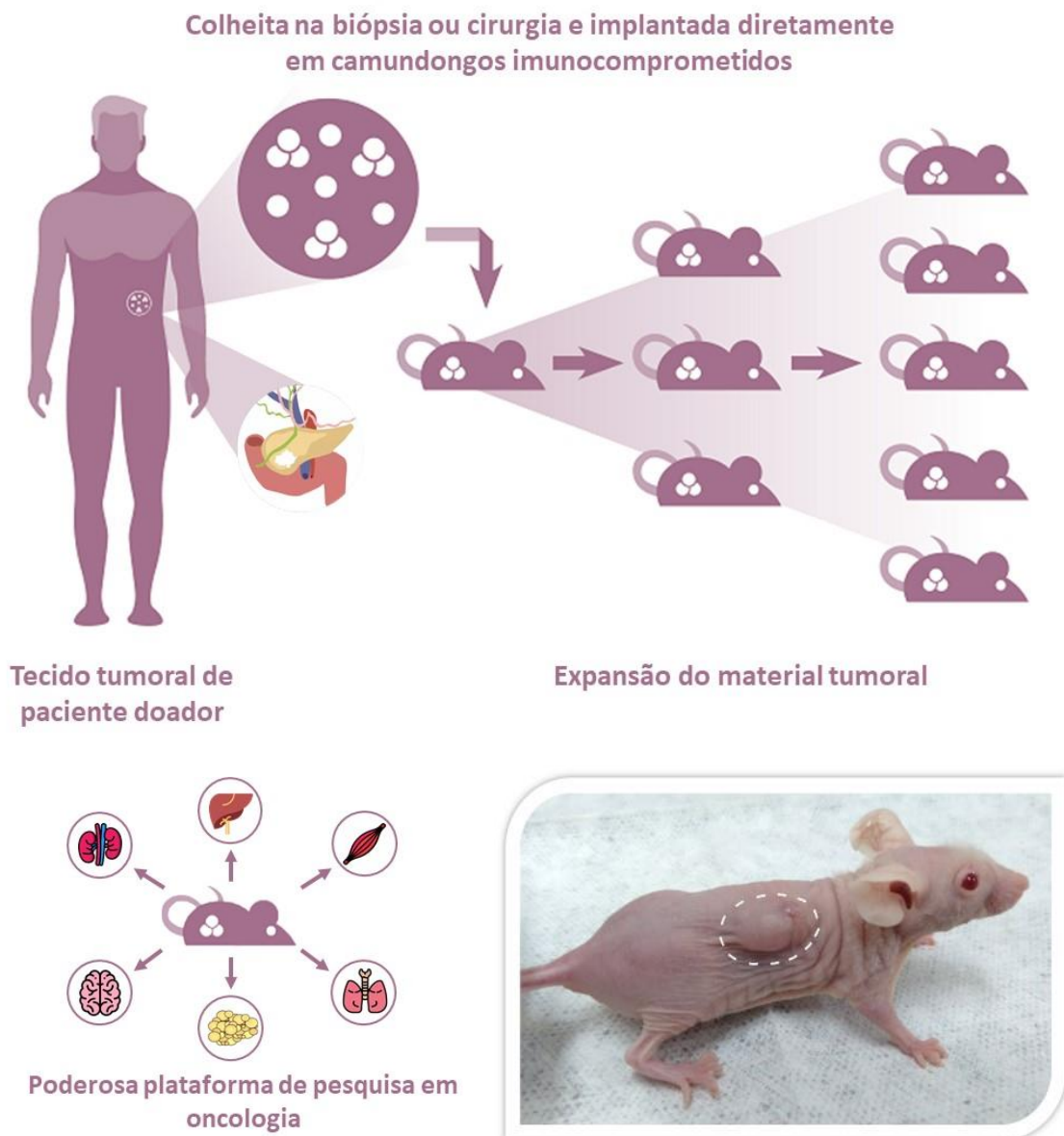


Figura 10: Procedimento geral para a geração do modelo de xenoenxerto derivado de paciente (PDX). O modelo de xenotransplante derivado de paciente envolve a coleta da amostra tumoral de um paciente, transplante de pequenos fragmentos dessa amostra para um animal receptor, monitoramento do crescimento tumoral e, se necessário, a passagem do PDX para um novo animal. Neste contexto, os camundongos imunodeficientes são comumente utilizados como modelos receptores, devido à reduzida taxa de rejeição do transplante. O PDX oferece uma plataforma valiosa para estudar o comportamento do tumor humano, testar tratamentos e investigar respostas individuais a terapias específicas, contribuindo para o desenvolvimento de terapias personalizadas e medicina de precisão.

Os xenoenxertos derivados do paciente aliviam alguns dos problemas levantados pelo uso de linhas celulares. Considera-se que os xenotransplantes diretos

do tumor mimetizam com mais precisão os tumores humanos do que os transplantes indiretos de linhagem celular se comparados os perfis histológicos e de expressão gênica de camundongos a pacientes (Rubio-Viqueira et al., 2009). Enquanto as linhas celulares crescem *in vitro* sob condições específicas de cultura de tecidos, apenas uma porcentagem destas crescerá quando transplantadas como xenoenxertos de linhagem celular, e um número menor formará metástases (Rottenber et al., 2010). Em contraste, as linhas PDX são, por sua natureza, estabelecidas e mantidas *in vivo*, e demonstraram reter um notável grau de fidelidade biológica, histológica, genômica, transcriptômica e de biomarcadores com seus tumores de origem (Dobrolecki et al., 2016). Eles são capazes de replicar com precisão o crescimento tumoral, a diversidade de células tumorais e progressão tumoral, incluindo potencial metastático (Tentler et al., 2012). Provavelmente, isso se deve aos efeitos do microambiente do tumor. Nos modelos PDX, as células tumorais crescem em microambientes tumorais fisiologicamente relevantes que imitam os níveis de oxigênio, hormônio e nutriente encontrados no local primário do tumor do paciente. A maioria dos xenoenxertos diretos cresce com elementos estromais consideráveis e recapitula a arquitetura histológica do tumor original do paciente após várias passagens em camundongos (Rubio-Viqueira et al., 2006). Os xenoenxertos diretos também têm sido utilizados para identificar e enriquecer subpopulações de células distintas, como células iniciadoras de tumor (células-tronco cancerosas), em uma variedade de sistemas de órgãos sólidos (Li et al., 2007; Al-Hajj et al., 2003). Quando utilizados adequadamente, os modelos de xenoenxerto direto também predizem com confiabilidade a resposta clínica às intervenções terapêuticas. Uma associação significativa foi observada entre as respostas aos medicamentos em pacientes e os modelos PDX correspondentes em 87% (112/129) dos resultados terapêuticos (Izumchenko et al., 2017). Além disso, vários pesquisadores relataram uma alta taxa de concordância de resposta ao medicamento em pacientes e seus modelos PDX (Zhang et al., 2013; Stewart et al., 2015), indicando que esses modelos podem funcionar como modelos “espelho” para os pacientes doadores. Assim, os modelos PDX são reconhecidos como modelos precisos e clinicamente relevantes. Em resumo, as principais características e vantagens dos modelos PDX são: (I) preservação do perfil genético do tumor primário e estabilidade ao longo de passagens em vários animais; (II) retenção das características histológicas e fenotípicas do tumor, como sua arquitetura de tecido, e

a manutenção dos componentes do estroma e das células-tronco, interações célula a célula e distribuição espacial; (III) amplificação do material tumoral para facilitar a análise da biologia do câncer, como caracterização tumoral e identificação de biomarcador; (IV) geração de uma coorte de camundongos com o mesmo tumor que pode ser usada como modelo pré-clínico para testar e prever a resposta ao medicamento anticâncer (Moiola et al., 2018).

Em contrapartida, embora representem uma das abordagens mais promissoras para o estudo da biologia do câncer e para o desenvolvimento de novas drogas anticâncer, os PDXs não são modelos perfeitos e apresentam as suas limitações. Primeiro, para estabelecer um modelo de tumor PDX, o período de latência pode variar entre 2 e 12 meses e a taxa de enxerto com sucesso varia entre 23 e 75%, dependendo do tipo de tumor (Radloff et al., 2008). Esses números se traduzem como obstáculo importante a sua eventual aplicação na medicina personalizada, refletindo em altos custos operacionais, o que torna inviável o estabelecimento rotineiro de modelos PDX. Segundos tumores de PDX são difíceis de manipular geneticamente, uma vez que não são mantidos *in vitro*, limitando o desempenho de estudos genéticos e de biologia celular. Terceiro, embora a heterogeneidade e a maioria das características biológicas originais do tumor sejam mantidas, apenas pequenos pedaços do tumor primário é usado, o que significa que há potencial perda de informações do tumor (Moiola et al., 2018). Outro inconveniente está relacionado ao sistema imunológico comprometido dos camundongos receptores, tornando os PDXs incapazes de recapitular com precisão as complexas interações entre as células neoplásicas e as células imunes, restringindo a avaliação de terapias com agentes imunomoduladores (Hidalgo et al., 2014). Em adição, o estroma humano do tumor transplantado no camundongo é substituído por estroma murino ao longo de diferentes gerações (Depreeuw et al., 2015). Por fim, a grande variabilidade metodológica, incluindo as linhagens animais utilizadas, com seus diferentes níveis de imunossupressão e as técnicas de implante (subcutâneo ou ortotópico), limita significativamente a consistência dos dados obtidos para um mesmo tipo de tumor, e dificulta a comparação entre os estudos (Hidalgo et al., 2014). Apesar dessas limitações, o uso dos PDXs emerge como um instrumento com grande potencial para avançar o conhecimento sobre a patogênese do câncer e de comorbidades

associadas ao câncer, como a caquexia para permitir o exame de abordagens inovadoras para o cuidado dos pacientes.

1.8. Modelo animal de caquexia induzida por xenotransplante de adenocarcinoma pancreático humano

A pesquisa do câncer se baseia em investigar sistemas-modelo que espelham a biologia de tumores humanos. Historicamente, a pesquisa da caquexia murina têm predominantemente utilizado linhagens celulares tumorais implantadas, como carcinoma de pulmão de Lewis (Marks et al., 2003; Marks et al., 2001), adenocarcinoma colorretal (Joppa et al., 2007; Vos et al., 2004), sarcomas singênicos (Marks et al., 2001; DeBoer et al., 2007) e outros tipos de neoplasias estáveis. Ainda que esses tumores demonstrem ser semelhantes, de muitas maneiras, às neoplasias causadoras de caquexia em humanos e sejam capazes de reproduzir as características-chave da caquexia do câncer, incluindo anorexia, perda de peso, perda de massa magra e gorda e aumento do gasto energético (Marks et al., 2003), as linhagens celulares implantadas não apresentam metástase significativa - uma diferença fundamental das neoplasias causadoras de caquexia em humanos. No que diz respeito à etiologia da caquexia, as linhas tumorais comumente usadas induzem a caquexia através da liberação de fatores indutores de caquexia (citocinas e prostaglandinas) e estimulação das interações tumor-hospedeiro (Deboer, 2009). Embora esses modelos tenham proporcionado a maior parte do conhecimento atual sobre caquexia, eles não representam totalmente a complexidade da caquexia do câncer humano. Portanto, é imperativo que os modelos animais para estudos pré-clínicos imitem de perto a condição humana para maximizar a tradução dos resultados.

Outro ponto que as linhagens celulares não conseguem reproduzir é a heterogeneidade caquética. Embora certos tipos de tumores sejam mais comumente associados à caquexia, mesmo com o mesmo tipo de tumor, há variações na extensão em que os pacientes apresentam caquexia. Por exemplo, no câncer de pâncreas, 85% dos pacientes se tornam caquéticos, mas 15% não (Tisdale et al., 2009). Essa

heterogeneidade pode resultar de alterações genéticas, transcriptômicas, epigenéticas e fenotípicas do tumor ou do hospedeiro que contribuem para o desenvolvimento da caquexia. A heterogeneidade do tumor pode ser dividida em heterogeneidade intertumoral e intratumoral. Acredita-se que a heterogeneidade intertumoral, que se refere à heterogeneidade entre pacientes que abrigam tumores do mesmo tipo histológico, resulte de fatores específicos do paciente, incluindo variações genéticas da linha germinativa, diferenças no perfil de mutação somática e fatores ambientais. Já a heterogeneidade intratumoral pode se manifestar como uma distribuição desigual de subpopulações tumorais geneticamente diversas dentro do próprio tumor, além de apresentar variações dinâmicas na diversidade genética ao longo do tempo (Dagogo-Jack et al., 2018). Apesar da proliferação de estudos de heterogeneidade tumoral na literatura, inclusive no PDA, questões fundamentais relacionadas à caquexia do câncer permanecem inexploradas. Desse modo, a compreensão mecanicista da dinâmica tumoral associada a caquexia é essencial para elucidar a força motriz por trás de cada padrão de debilidade.

Ainda que seja difícil postular os mecanismos específicos que levam a heterogeneidade caquética, propõe-se que diferenças nos *drivers* moleculares podem estar envolvidas. Por exemplo, os tumores expressam níveis variáveis de citocinas pró-inflamatórias, uma fonte potencial de variação (Gerber et al., 2018). Em uma era da medicina de precisão, esses perfis de citocinas podem ter valor como uma ferramenta de diagnóstico e prognóstico, no sentido de compreender o potencial metastático e prevenir a caquexia do câncer. Além disso, polimorfismos de nucleotídeos germinativos em genes ligados às taxas de produção de citocinas estão associados ao desenvolvimento de caquexia (Tan et al., 2010), especificamente em relação à IL-6 no cenário de câncer pancreático (Zhang et al., 2008), sugerindo que a genética do paciente pode estar na raiz do fenótipo da caquexia. Curiosamente, o grau de caquexia parece não estar relacionado à carga tumoral. Em vez disso, pode estar relacionado à interação imunológica do hospedeiro com o tumor em nível local e sistêmico. É provável que algumas citocinas apenas atuem localmente e causem a regulação positiva de outras citocinas que têm um efeito sistêmico. Essas citocinas podem conduzir a expressão de genes relacionados à atrofia no músculo, levando à caquexia (Gerber et al., 2018). Dada a heterogeneidade do câncer e as diferenças entre pacientes, estudos recentes destacaram a necessidade de expandir e

caracterizar rigorosamente métodos experimentais para modelar a caquexia humana (Michaelis et al., 2017).

Dentro de um contexto sistêmico metabólico complexo, o uso de modelos PDX permite entender melhor os perfis das citocinas no microambiente tumoral e na circulação sistêmica e a relação com a caquexia do câncer. Os modelos PDX preservam a heterogeneidade caquética encontrada em pacientes e estão associados a perfis exclusivos de citocinas entre diferentes PDX, afetando o fenótipo caquético (Gerber et al., 2018). Além disso, o modelo PDX oferece a capacidade de avaliar o tecido de câncer humano e citocinas humanas. Ao avaliar 53 pacientes com PDA avançado, Kays et al. (2018) identificaram três fenótipos distintos de caquexia. A maioria dos pacientes (64%) teve perda de massa muscular e gordura, enquanto 17% tiveram perda somente de gordura e 19% não apresentaram perda de massa muscular. Conseqüentemente, o fato de múltiplos fenótipos emergirem nesta população uniforme levanta a suspeita de que a heterogeneidade molecular e / ou genética está presente nos tumores ou nos hospedeiros. Em uma era de crescente interesse na medicina personalizada, modelos PDX permitem a implantação de tecido tumoral de vários pacientes para fornecer diversidade genética e, além disso, elucidar essas diferenças poderia levar a terapias mais direcionadas. As diferenças genéticas entre os indivíduos contribuem para a suscetibilidade diferencial ao câncer e, sem dúvida, à eficácia e toxicidade variáveis da terapêutica farmacológica (Radloff et al., 2008). Dessa forma, o desenvolvimento e a padronização de modelos animais podem aumentar a previsibilidade da resposta à terapia anticaquética e ser utilizada como ferramenta para otimizar o cuidado de pacientes com caquexia.

Estabelecer modelos adequados é uma das pedras angulares da pesquisa sobre a caquexia. Para projetar uma terapia que aborda as causas e manifestações da caquexia, se faz necessário expandir a compreensão da fisiopatologia da caquexia por meio de modelagem pré-clínica. Como a caquexia está, por definição, ligada aos processos subjacentes às doenças, um modelo de caquexia deve ser capaz de atender a três critérios: (i) o processo subjacente à doença é conhecido por causar caquexia nos humanos; (ii) o processo da doença e a caquexia resultante podem ser induzidos de forma reproduzível e consistente em um organismo modelo; e (iii) o modelo recapitula um número máximo de sistemas e processos implicados na caquexia (Michaelis et al., 2017).

Com esses critérios em mente, uma estrutura fisiopatológica ideal para a pesquisa de caquexia é o adenocarcinoma ductal pancreático (PDA). Dentre todas as formas de malignidade, pacientes com PDA têm a maior prevalência e frequentemente desenvolvem os graus mais graves de caquexia, manifestando-se em aproximadamente 83% dos casos (Wingmore et al., 1997). Ainda que a resistência às terapias atuais e o difícil diagnóstico da malignidade em estágio inicial sejam importantes fatores para a alta taxa de mortalidade de pacientes com PDA, a síndrome da caquexia também contribui para a baixa sobrevida dessa doença, estimando-se que seja a causa direta da morte em 33% de todos os pacientes com câncer de pâncreas (Bachmann et al., 2009), e muitos outros tornam-se incapazes de tolerar tratamentos de quimioterapia ou cirurgia devido à diminuição do status de desempenho associado à caquexia (Prado et al., 2007; Ross et al., 2004). Em pacientes com câncer de pâncreas, a perda de peso é um sintoma de apresentação com perda de peso média de 14,2% entre os indivíduos. Essa perda é progressiva nos 6 meses seguintes, aumentando para aproximadamente 24,5% na última avaliação antes da morte (Khaled et al., 2014). A perda de peso é um importante fator prognóstico no câncer; portanto, quanto maior a extensão da perda de peso, menor o tempo de sobrevivência. Uma possível razão para as abordagens atuais não terem sucesso na sobrevivência a longo prazo é que elas não tratam a caquexia, que é uma das principais causas subjacentes da mortalidade por PDA (Aoyagi et al., 2015). Assim, à medida que a pesquisa continua a diagnosticar e tratar o PDA de maneira mais eficaz, o gerenciamento da caquexia fornece uma estratégia adicional para diminuir a morbimortalidade do paciente.

Nas últimas décadas, tem havido um interesse crescente no desenvolvimento de modelos de camundongos que reproduzem de perto a condição humana. No entanto, devido à escassez de modelos que recapitem os diferentes fenótipos da caquexia em uma população homogênea de doenças, pesquisas que buscam esclarecer as diferenças clínicas, moleculares e genéticas entre os mesmos tipos de tumores de pacientes distintos são indicadas, pois as terapias que visam a causa precisa da caquexia são essenciais para alcançar resultados ideais. De fato, uma das razões para a alta taxa de falhas de novos agentes nos estudos clínicos de fase III, é a falta de modelos pré-clínicos que capturam a heterogeneidade dos tumores nos pacientes (Siolas et al., 2013). Em contrapartida, estudos recentes indicam que os

xenoinxertos de câncer pancreático direto podem ser utilizados para rastrear efetivamente agentes terapêuticos quando implantados heterotopicamente em camundongos nus (Rubio-Viqueira et al., 2006). Esses sistemas são úteis para modelar a condição humana, contornar as restrições e lidar com problemas de estudos clínicos e explorar diferentes estratégias para fins terapêuticos.

1.9. Modulação controlada de óxido nítrico para terapia da caquexia do câncer

A modulação do estresse oxidativo pode ser uma abordagem plausível para reduzir o hipermetabolismo e as perdas de proteína do músculo esquelético associadas à caquexia. Um obstáculo a essa abordagem é a necessidade de desenvolver um sistema antioxidante que seja capaz de penetrar na matriz mitocondrial para ajudar a reduzir diretamente o excesso de ROS mitocondriais. Recentemente, um crescente corpo de evidências tem sugerido o óxido nítrico (NO) como um sistema de defesa antioxidante essencial para a manutenção da homeostase oxidativa celular (Tousoulis et al., 2012).

O NO é uma molécula de gás hidrofóbico com alto coeficiente de difusão, capaz de interagir com diversos alvos intracelulares para regular uma série de processos fisiológicos, como vasodilatação, permeabilidade vascular, broncodilatação, inflamação, angiogênese, agregação plaquetária, expressão gênica, comunicação neuronal, secreção hormonal, mobilidade gastrointestinal e cicatrização de feridas (Alimoradi et al., 2019). Especificamente, o papel do NO na regulação da atividade fisiológica do músculo esquelético, inclui o acoplamento excitação-contração, autorregulação do fluxo sanguíneo, homeostase do cálcio, bioenergética, miogênese e reparação muscular (De Palma et al., 2012).

O NO é gerado no ciclo citrulina-NO pela atividade enzimática da NO sintase (NOS) (Figura 11), uma família de enzimas NADPH-dependentes presentes na maioria das células e tecidos (Stuehr et al., 2019). São conhecidas três isoformas de NOS, codificadas por diferentes genes: a NOS endotelial (eNOS) que está presente principalmente no endotélio vascular e é codificada pelo gene NOS3; a NOS neuronal

(nNOS), codificada pelo gene NOS1, é expressa predominantemente no tecido nervoso e no músculo esquelético; e por fim, a NOS induzível (iNOS) codificada pelo gene NOS2 que exerce um papel no sistema imunológico e cardiovascular (Zhou et al., 2018). Dentre as três isoformas de NOS, a nNOS e a eNOS são consideradas cNOS, ou seja, são expressas constitutivamente. Por outro lado, a iNOS é expressa em resposta a estímulos inflamatórios (Guimarães et al., 2021).

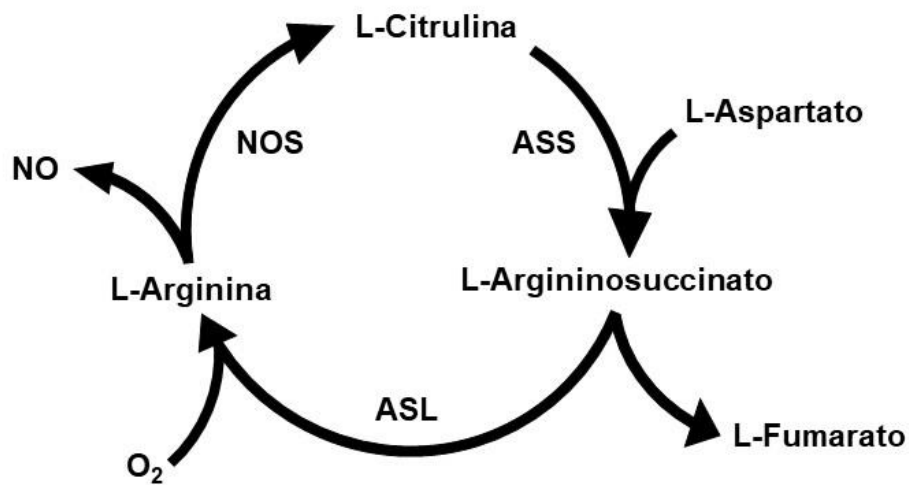


Figura 11: Representação esquemática do ciclo citrulina-NO. A via da citrulina-NO é uma importante rota bioquímica que envolve a produção de óxido nítrico a partir da arginina. Nessa via, a arginina é convertida em citrulina pela ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS). A NOS catalisa a oxidação da arginina e a produção de citrulina, simultaneamente liberando uma molécula de óxido nítrico. A via da citrulina-NO desempenha um papel fundamental na homeostase e na função normal do organismo, sendo alvo de estudos e pesquisas devido às suas implicações em várias condições fisiológicas e patológicas. Legenda: NOS - Óxido nítrico sintase; ASS - argininosuccinato sintase; ASL - argininosuccinato liase.

Todas as três isoformas da NOS são expressas no músculo esquelético. A nNOS foi detectada em vários músculos humanos, incluindo os músculos gastrocnêmio e tibial anterior. A NOS neuronal é abundante na superfície das fibras do tipo II (contração rápida), enquanto é menos representada nas fibras do tipo I (contração lenta) (Kapur et al., 1997). Da mesma forma, a eNOS foi descrita em vários músculos como uma proteína da membrana periférica. Em contrapartida, o RNA mensageiro da iNOS está ausente ou presente em níveis muito baixos nos músculos

esqueléticos em condições fisiológicas (De Palma et al., 2012). Ambos nNOS e eNOS produzem NO em níveis fisiológicos baixos por curtos períodos. Por outro lado, a iNOS é expressa no músculo esquelético principalmente sob condições inflamatórias graves. Sua ativação é induzida por vários agentes, incluindo lipopolissacarídeos e citocinas, como interferon- γ , IL-1 ou TNF- α , e produz um excesso temporário de NO (Coleman, 2001). Adicionalmente, estudos demonstram que a iNOS tem preferência pela utilização da L-arginina citosólica para a produção de NO (Xia et al., 1997), enquanto a cNOS depende de um reservatório compartimentalizado de L-arginina que é produzido a partir da reciclagem da L-citrulina pelo ciclo citrulina-NO (Flam et al., 2007). Nesse sentido, a enzima arginossuccinato sintase (ASS), que é a enzima limitante desse ciclo (Lameu et al., 2010), controla estritamente a produção de NO pela cNOS. Por outro lado, a iNOS é capaz de produzir altos níveis de NO por períodos prolongados, uma vez que a concentração citosólica de L-arginina não é limitada (Guimarães et al., 2021; Coleman, 2001). Contudo, se o NO desempenha um papel protetor ou prejudicial na regulação da massa muscular depende de seu efeito quantitativo, precursor e distribuição nas células do músculo esquelético.

A perda muscular específica do tipo de fibra pode ser devido a diferenças intrínsecas no sistema oxidante / antioxidante. Como já comentado, os músculos oxidativos (predominantemente fibras do tipo I e / ou IIa) são mais resistentes à atrofia do que os músculos glicolíticos (predominantemente fibras do tipo IIx e / ou IIb) (Acharyya et al., 2005). Ainda que a relação entre os mecanismos moleculares e a perda muscular específica do tipo de fibra permaneça pouco elucidada, foi demonstrado que os músculos oxidativos têm expressão e atividade mais robustas de enzimas antioxidantes do que os músculos glicolíticos (Hollander et al., 1999), e há menos produção de superóxido mitocondrial nas miofibras oxidativas do que nas miofibras glicolíticas (Anderson et al., 2006), sugerindo que um sistema antioxidante fornece proteção adicional contra o catabolismo muscular (Figura 12). A propósito, sob condições de estresse oxidativo excessivo, o NO é descrito como uma importante defesa antioxidante, pois neutraliza rapidamente radicais, especialmente o superóxido, neutralizando-o e protegendo as células contra a indução de processos oxidativos (Soneja et al. 2005, Toledo et al. 2012, Lira et al. 2007). Em suas pesquisas, Yu et al. (2008) apresentaram três principais descobertas: (I) a oxidação de proteínas e a expressão de ligases E3 foram menores nos músculos oxidativos do que nos

glicolíticos em resposta a estímulos caquéticos; (II) a produção de NO e a expressão de genes antioxidantes foram maiores nos músculos oxidativos do que nos glicolíticos; e (III) doadores de NO atenuaram as respostas musculares atroficas tanto *in vitro* quanto *in vivo*. À vista disso, levanta-se a possibilidade da relação de causa-efeito entre as defesas antioxidantes dependentes de NO e a proteção muscular, devido à maior produção de NO por músculos oxidativos em comparação com músculos glicolíticos.

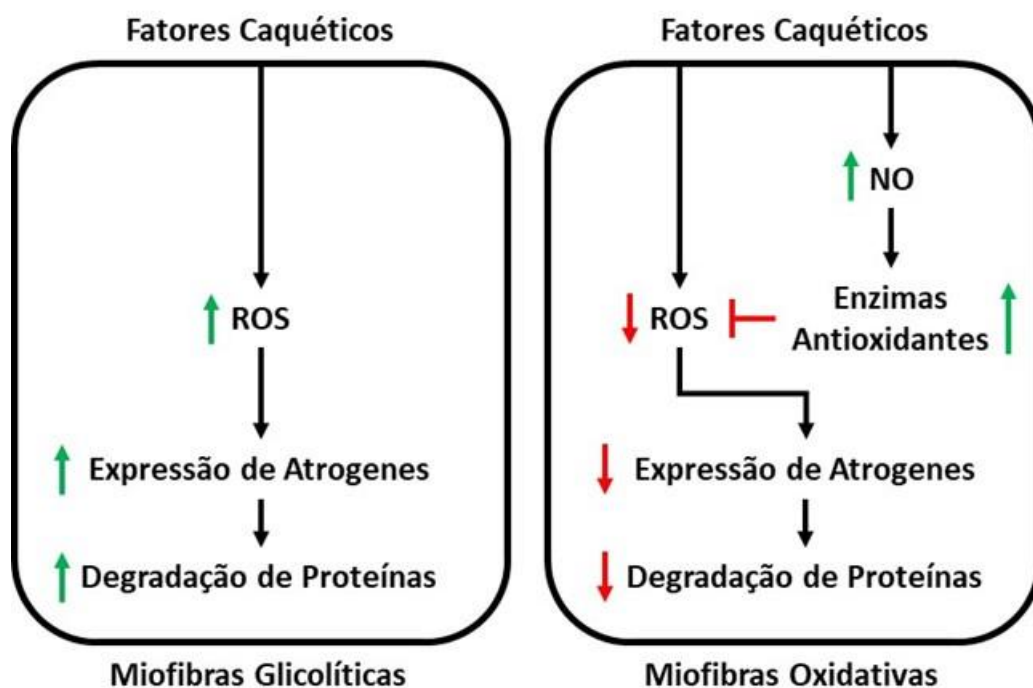


Figura 12: Representação esquemática de proteção associada ao fenótipo oxidativo contra a perda de massa muscular. Os músculos oxidativos possuem uma maior capacidade de utilização de gorduras como fonte de energia, o que os torna menos propensos a degradação proteica para suprir as necessidades energéticas do organismo. Além disso, os músculos oxidativos apresentam uma maior expressão de enzimas antioxidantes, que auxiliam na neutralização de espécies reativas de oxigênio, prevenindo danos oxidativos e inflamação crônica, que são fatores importantes na progressão da caquexia. Adaptado de Yu et al. (2008).

A interação entre NO e ROS modula o tônus vascular. A isoforma eNOS mantém o tônus vascular por meio da síntese intrínseca de NO, inibindo a adesão de

leucócitos e plaquetas ao endotélio impedindo o estado pró-inflamatório. Sugere-se que o aumento da produção de ROS esteja relacionado a supressão da expressão e função da eNOS (Farrow et al., 2008). Além disso, o peroxinitrito resultante da eliminação de NO por ROS, não apenas oxida o DNA, proteínas e lipídios, mas também induz a apoptose e interfere em importantes vias de sinalização vascular. Assim, o aumento de ROS e subsequente aumento de peroxinitrito são conhecidos por reduzir a biodisponibilidade do NO e causar disfunção endotelial (Matsubara et al., 2015). Em contrapartida, uma vez que o endotélio desempenha um papel fundamental na regulação do recrutamento de células do sangue durante a inflamação (Dimmeler et al., 1997), a função do NO em atuar como mecanismo de controle intracelular para proteger as células endoteliais de serem levadas à apoptose sob estimulação de espécies reativas e citocinas pode contribuir para a integridade de células endoteliais.

Por mais que o NO exerça uma ampla gama de efeitos no contexto tumoral (Coutinho et al., 2023), vale salientar que seus efeitos variam entre pró-tumorais e anti-tumorais, bem como pró-metastáticos e anti-metastáticos, dependendo das concentrações celulares. Em concentrações baixas, o NO pode promover a angiogênese, estimular a proliferação celular, oferecer proteção celular, proteger contra a morte celular programada, porém, também pode aumentar a capacidade invasiva das células tumorais e favorecer a metástase (Alimoradi et al., 2019). Por outro lado, em concentrações elevadas, o NO tem potencial para causar danos no DNA, intensificar o estresse oxidativo devido à excessiva produção de óxido nítrico, promovendo a citotoxicidade e estimular a apoptose. Essa dualidade de efeitos é frequentemente evidenciada em estudos recentes (Alimoradi et al., 2019; Guimarães et al., 2021; Stuehr et al., 2019).

Além do status antioxidante, o NO tem implicações no equilíbrio pró-inflamatório das citocinas e nos mecanismos apoptóticos. Conforme citado, a liberação de citocinas e a regulação positiva dos genes inflamatórios dependem em grande parte da ativação intracelular do fator de transcrição NF- κ B. Estudos sugerem que o NO pode ser importante na regulação da intensidade e duração da ativação de citocinas pró-inflamatórias por estabilizar o I κ B, a proteína principal responsável pelo controle da ativação do NF- κ B (Peng et al., 1995). Além disso, o NO é um fator angiogênico potente, e a angiogênese também pode contribuir significativamente para o reparo muscular (Schgoer et al., 2009). Esses argumentos reforçam a alegação

sobre a importância primária do NO como um potencial protetor e modulador dos danos promovidos pela caquexia.

1.10. Peptídeo Potenciador de Bradicinina 10c (Bj-PRO-10c)

A caquexia é reconhecida há muito tempo como um efeito adverso do câncer. Além de não existirem métodos de prevenção existentes, o tratamento atual em pacientes com neoplasia maligna é paliativo e multimodal, ou seja, não há terapia padrão. Embora algumas drogas isoladas aparentemente melhorem os desfechos clínicos, as abordagens mais efetivas ainda são terapias combinacionais direcionadas aos diferentes mecanismos que contribuem para o desenvolvimento da caquexia. Apesar dos esforços, a busca sistemática por uma terapia para prevenir ou efetivamente reverter a síndrome de caquexia tem sido infrutífera e decepcionante até agora. Diante disso, novas pesquisas são extremamente necessárias nesta área, a fim de encontrar terapias eficazes e melhorar a qualidade de vida do paciente. De fato, a possibilidade de prevenir a caquexia do câncer também pode ser considerada, de modo que os pacientes possam responder melhor ao tratamento antitumoral e, espera-se, serem curados.

Na última década, tem-se demonstrado que alguns peptídeos bioativos isolados da peçonha da serpente *Bothrops jararaca*, os BPPs (peptídeos potenciadores da bradicinina), podem modular a produção de NO via regulação do ciclo citrulina-NO (Guerreiro et al., 2009). Esses oligopeptídeos são compostos por 5-14 resíduos de aminoácidos com um piruglutamato e um resíduo de prolina nas posições N- e C- terminais, respectivamente (Ferreira et al., 1970; Ondetti et al., 1984). Essas características químicas conferem a esses peptídeos uma atratividade significativa no âmbito da investigação e desenvolvimento de medicamentos. Devido ao notável conteúdo de prolina, estes peptídeos demonstram capacidade de atravessar as membranas celulares e manter sua estrutura intacta por horas (Liu et al., 2018), além de serem resistentes contra a degradação por enzimas como aminopeptidases, carboxipeptidases e endopeptidases (Cheung et al. 1973). Esses peptídeos bioativos exibem diversas características vantajosas para servirem como

candidatos iniciais no desenvolvimento de medicamentos, alinhando-se com as abordagens contemporâneas de criação de fármacos baseados em toxinas e de formulação de terapias direcionadas a múltiplos alvos para doenças complexas, como é o caso da caquexia.

O primeiro alvo identificado desses peptídeos foi a enzima conversora de angiotensina I (ECA). Devido a ação como inibidores da ECA, esses peptídeos serviram como modelo estrutural e levaram ao desenvolvimento do primeiro inibidor não-peptídico dirigido a essa enzima, o captopril, um dos medicamentos mais bem-sucedidos para o tratamento da hipertensão (Georgopapadakou et al., 1981). Além de ter como alvo molecular a ECA, alguns desses oligopeptídeos, assim como o Bj-PRO-10c (ou BPP-10c, <pENWPHPQIPP>), interagem também com a argininosuccinato sintase (ASS), promovendo o aumento da atividade *in vitro* e *in vivo*, um mecanismo importante para controlar e manter os níveis de NO (Guerreiro et al., 2009). Os compostos que aumentam a atividade da ASS e que sustentam a produção de NO (evitando a produção excessiva) podem garantir a biodisponibilidade adequada dessa molécula para o funcionamento fisiológico adequado. Relatos demonstram que os níveis de expressão da ASS estão alterados numa ampla variedade de tecidos tumorais comparado ao tecido normal correspondente, que são elevados em cânceres gástricos e colorretais, mas são frequentemente regulados negativamente em carcinomas hepatocelulares, melanomas e mesoteliomas (Huang et al., 2013). Além disso, a ASS é uma enzima biomarcador preditivo para o desenvolvimento de metástase e está associada com prognóstico clínico ruim (Nicholson et al., 2009; Huang et al., 2013). Adicionalmente, a produção de NO sustentada pela L-arginina no ciclo citrulina-NO, preserva a L-arginina intracelular à outras funções metabólicas (Flam et al., 2007), além de aumentar sua disponibilidade para o uso de células do sistema imunológico, reduzindo as taxas de infecção, especialmente em situações que comprometem a função imunológica. Notavelmente, no caso de limitação de L-arginina, como em condições fisiopatológicas, a NOS também pode produzir superóxido (Westphal et al., 2008).

Além disso, as propriedades químicas desses peptídeos os tornam compostos atrativos para o desenvolvimento de drogas. Por exemplo, o Bj-PRO-10c é um decapeptídeo rico em prolina, característica que lhe confere propriedades de penetração celular e resistência à proteólise (Gilio et al., 2013). Adicionalmente, o Bj-

PRO-10c diminui a peroxidação lipídica, protege contra o estresse oxidativo e ainda mantém o potencial de membrana mitocondrial (Querobino et al. 2018).

Outro possível alvo para o Bj-PRO-10c é o sistema nervoso central (SNC), uma vez que o decapeptídeo identificado acima também foi encontrado no cérebro de camundongos após administração sistêmica (Silva et al., 2008), sugerindo que o Bj-PRO-10c pode atravessar a barreira hematoencefálica, provocando efeitos mediados centralmente. De fato, *in vitro*, o Bj-PRO-10c altera a liberação dos neurotransmissores GABA e glutamato (Lameu et al., 2010), além de potencializar o ciclo da citrulina-NO (Oliveira et al., 2010). Em conjunto, esses efeitos neuronais podem realizar modulação de diversas funções como autonômica, comportamental e outras.

Visto que o Bj-PRO-10c apresenta inúmeras características vantajosas, consistentes com as tendências atuais do desenvolvimento de fármacos inspirados em toxinas, investigar a eficiência desse peptídeo em caquexia induzida por adenocarcinoma ductal pancreático (PDA) abre oportunidades para o desenvolvimento de drogas que combinem a ECA e ASS como alvos moleculares, inibindo a formação de Ang II e induzindo a reciclagem de L-arginina / NO, e assim, bloqueando as vias de transdução de sinal de caquexia (Figura 13).

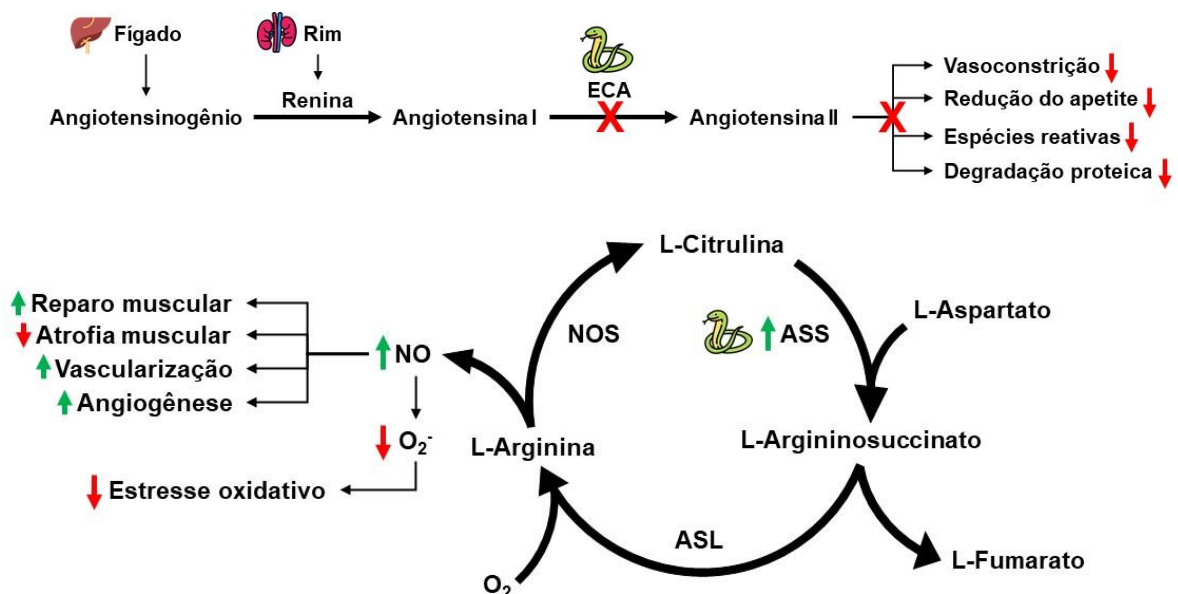


Figura 13: Representação esquemática do potencial terapêutico do Bj-PRO-10c como modulador da caquexia. O oligopeptídeo Bj-PRO-10c apresenta efeito inibitório sobre a

enzima conversora de angiotensina (ECA), impedindo a formação de angiotensina II (Ang II). Além disso, ele interage com a argininosuccinato sintase (ASS), aumentando sua atividade tanto em testes *in vitro* quanto *in vivo*, promovendo o controle dos níveis de óxido nítrico (NO). Ao investigar sua eficiência na caquexia induzida pelo adenocarcinoma ductal pancreático, abrem-se novas oportunidades de desenvolver medicamentos que combinem ECA e ASS como alvos moleculares. Essa combinação inibiria a formação de Ang II e estimularia a reciclagem de L-arginina / NO, bloqueando assim as vias de sinalização da caquexia. Legenda: NOS - Óxido nítrico sintase; ASS - argininosuccinato sintase; ASL - argininosuccinato liase.

Considerando que a pesquisa sobre os mecanismos da caquexia e terapêutica tem o potencial de fornecer benefícios clínicos e até de sobrevivência para pacientes com câncer, o presente trabalho teve como um de seus objetivos estabelecer as características principais de dois modelos animais de caquexia associada ao PDA, criando plataformas poderosas para estudos futuros que explorem os sistemas fisiológicos envolvidos na caquexia e para novas intervenções que impedem, retardam ou revertem esse fenômeno. Postulamos que esses modelos pré-clínicos devem ser comparados com a caquexia do câncer em humanos principalmente em termos de carga tumoral, efeitos na ingestão de alimentos, peso e composição corporal, atividade locomotora, estado inflamatório e tendência a metástase. Adicionalmente, esses modelos foram submetidos a uma nova abordagem terapêutica multimodal que possui ações sinérgicas em diferentes vias relacionadas ao desenvolvimento da caquexia. Finalmente, e acima de tudo, o desenvolvimento de um droga anti-caquética para a prevenção e tratamento da caquexia do câncer se faz extremamente impactante na clínica médica para combater essa doença silenciosa, pois pode melhorar a qualidade de vida e aumentar a expectativa de vida dos pacientes, além de diminuir custos com hospitalizações, complicações secundárias e, o mais importante, casos de mortes em todo o mundo.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

(I) Estabelecer e caracterizar um modelo animal de caquexia induzida por xenotransplante de adenocarcinoma pancreático humano a partir de biópsias de dois pacientes e; (II) avaliar o potencial do Bj-PRO-10c em aliviar sintomas e alterações metabólicas provocados pela caquexia induzida por PDA nos modelos animais.

2.2. Objetivos específicos

- Mimetizar a perda de massa muscular e tecido adiposo observada em pacientes com câncer pancreático em camundongos por meio do xenotransplante de PDA;
- Avaliar a ingestão de alimentos ao longo do tempo através da medição da quantidade de alimentos consumida a cada 72h;
- Monitorar o desempenho comportamental dos animais, incluindo atividade locomotora, níveis de ansiedade e força sustentada, por meio de testes comportamentais realizados no teste de campo aberto.
- Avaliar as manifestações locais da caquexia em vários tecidos, incluindo músculos esqueléticos, tecido adiposo, coração, fígado, baço, rim, pulmão e cérebro, por meio de medições e pesagens;
- Analisar a expressão de genes catabólicos e termogênicos nos músculos esqueléticos e tecido adiposo utilizando a técnica de qRT-PCR;
- Avaliar os efeitos da administração crônica do Bj-PRO-10c nos modelos *in vivo* comparando camundongos tratados com camundongos não tratados;
- Avaliar os efeitos do Bj-PRO-10c *in vitro* contra o estresse oxidativo em mioblastos, medindo a produção de superóxido ao longo do tempo.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Metodologia *in vitro*

3.1.1 Síntese e Purificação

A síntese de Bj-PRO-10c (ENWPHPQIPP) foi realizada em um sintetizador automatizado de peptídeos PSSM-8 (Shimadzu Corp., Kyoto, Japão) por um método de fase sólida passo a passo usando a química de N-9-fluorenilmetoxycarbonil (Fmoc) (Novabiochem-EMD Chemicals, San Diego, CA). A clivagem do péptido da resina foi realizada por tratamento com uma mistura de ácido trifluoroacético (TFA)/1,2-etanoditiol/sulfureto de etilmetilo durante 2 h à temperatura ambiente. Após a remoção da resina por filtração e lavagem com TFA, o peptídeo sintético bruto foi purificado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) de fase reversa preparativa (Shimadzu Corp) em uma coluna YMC-Pack ODS (20 mm x 150 mm) (YMC, Kyoto, Japão), usando um gradiente linear de 3 a 20% de CH₃CN em 0,1% de TFA, a uma taxa de fluxo de 7 ml/min. Tanto a pureza quanto a estrutura primária de cada peptídeo sintético foram confirmadas por HPLC analítica e Espectrometria de massa MALDI-TOF (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia). As amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e depois liofilizadas (Edwards Freeze Dryer Super Modulyo Pirani 1001, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) por 48h a – 50°C sob vácuo.

3.1.2 Linhagem e cultivo celular

- (C2C12 ATCC® CRL-1772™) – Mioblastos murinos

Os mioblastos C2C12 foram cultivados a baixa densidade celular para evitar a diferenciação no meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Invitrogen, Carlsbad, CA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 100 µg / mL de

estreptomicina, 100 U / mL de penicilina e 1,5 g / L bicarbonato de sódio a 5% de CO₂ e 37°C.

- MIA PaCa-2 – Linhagem celular de câncer de pâncreas humano

As células MIA PaCa-2 foram mantidas em meio DMEM (Invitrogen, Carlsbad, CA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 2,5% de soro de cavalo, 100 µg / mL de estreptomicina, 100 U / mL de penicilina e 1,5 g / L bicarbonato de sódio a 5% de CO₂ e 37°C.

- PDA08 – Cultura primária de células PDX (células de adenocarcinoma ductal pancreático)

A linhagem celular PDA08 foi isolada a partir do tumor sólido derivado do paciente 08 com adenocarcinoma ductal pancreático, conforme realizado e descrito pelo colaborador Moraes (2018). Para a realização desse procedimento, o xenotumor foi separado, submetido a uma lavagem com RPMI-1640 sem soro e posteriormente transferido para uma placa de cultura de 60 mm. Utilizando um bisturi, coágulos sanguíneos e tecido conjuntivo provenientes do animal hospedeiro foram removidos e a amostra foi lavada novamente com PBS. Pequenas porções do tumor, pesando aproximadamente 100 mg, foram então transferidas para novas placas de cultura de 60 mm contendo um meio completo composto por RPMI-1640 suplementado com soro bovino fetal (10%), fator de crescimento epidérmico (20 ng/mL; Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e toxina colérica (100 ng/mL; Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA). Essas porções foram dissociadas utilizando um bisturi até formarem uma suspensão composta por células isoladas e pequenos fragmentos de tecido tumoral. As células foram mantidas em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino, a 37°C em atmosfera 5% de CO₂, originando a linhagem imortal PDA08.

3.1.3. Preparação do meio condicionado

Para preparar o meio condicionado de adenocarcinoma de pâncreas, as células PDA08 e MIA PaCa-2 foram semeadas a uma densidade de $0,3 \times 10^6$ células por poço em placas de múltiplos poços. Uma vez atingida a fase de subconfluência, os poços foram lavados com PBS e o meio celular foi substituído por meio novo, e as células permaneceram em cultivo por mais 24h. Em seguida, o meio condicionado foi recolhido, centrifugado (1000xg durante 10 min) e o conteúdo foi transferido para novos tubos e armazenado a -80°C até a sua utilização.

3.1.4. Ensaio MTT – Viabilidade Celular

Após o período de tratamento com o peptídeo as células foram utilizadas para o teste colorimétrico de MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]}. Para a realização do teste de viabilidade, as células C2C12 em diferentes condições (Tabela 1) foram incubadas em placas de 96 poços em meio de cultura com 10 μl de solução MTT por poço para obter uma concentração final de 0,5 mg / ml, durante 3 horas a 37°C . Feito isto, as células foram coletadas e os cristais de formazan resultantes da redução do MTT, foram dissolvidos numa solução de DMSO por 30 minutos com agitação suave e a absorbância foi medida no comprimento de onda de 570 nm em leitor de microplacas (Flexstation, Molecular Devices). Os valores da viabilidade celular foram expressos em porcentagem relativamente à absorbância determinada nas células do grupo controle.

Tabela 1 – Grupos experimentais utilizados no ensaio de viabilidade celular.

Tipo celular	Meio condicionado	Tratamento com Bj-PRO-10c (10 μM)
C2C12	Meio comum	Não
C2C12	Meio comum	Sim
C2C12	PDA08	Não

C2C12	PDA08	Sim
C2C12	MIA PaCa-2	Não
C2C12	MIA PaCa-2	Sim

3.1.5. Detecção da produção de superóxido

A produção de superóxido pelas células foi quantificada por método fluorimétrico utilizando o reagente dihidroetídio (DHE, D11347 Invitrogen) que reage com superóxido gerando o produto fluorescente 2-hidroxi-etídio. Após o tratamento das células com o peptídeo foi adicionado o corante azul fluorescente DHE com concentração final de 75 μ M ao meio de cultura e alojadas em uma câmara fechada protegida contraluz a 37° C por 30 min. O produto fluorescente formado pela oxidação do dihidroetídio na presença de radicais de superóxido foi visualizado via microscopia de fluorescência (λ excitação = 520 nm; λ emissão = 610 nm) durante 2 horas em leitor de placas (Flexstation, Molecular Devices). Os valores obtidos foram usados para traçar curvas de fluorescência de mioblastos não diferenciados submetidos a diferentes condições de meio condicionado (Tabela 1).

3.2. Metodologia *in vivo*

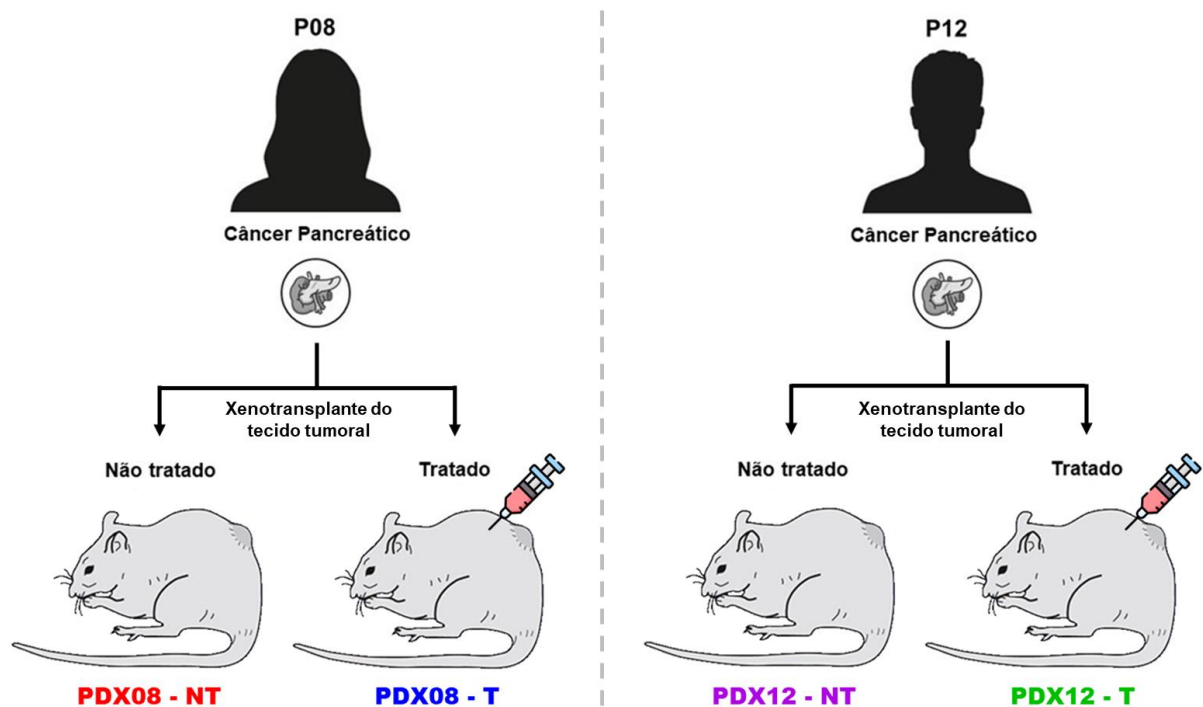


Figura 14: Representação esquemática do planejamento experimental *in vivo*.

3.2.1. Aspectos éticos e normativos

A coleta e utilização de amostras humanas de adenocarcinoma ductal pancreático foi realizada com a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEPesq) do Hospital Sírio Libanês (Parecer nº 834.279) (Apêndice A), e o processo está devidamente registrado na Plataforma Brasil do Ministério da Saúde. Todas as amostras foram obtidas com consentimento esclarecido dos pacientes. A paciente 08 (doadora do PDX08) era do sexo feminino, diabética, apresentou emagrecimento acentuado e faleceu com carcinomatose avançada (adenocarcinoma ductal moderadamente diferenciado; TNM = pT3pN1M0). O exame histopatológico do paciente 08 identificou um tumor com 4,5 cm de comprimento máximo, histologicamente classificado como adenocarcinoma ductal com margem de ressecção cirúrgica pancreática livre e metástase para um (01) de um total de trinta e quatro (34) linfonodos regionais dissecados (01/34). O paciente 12 (doador de PDX12) era do sexo masculino, sem histórico de emagrecimento, e faleceu logo após o início da quimioterapia

(adenocarcinoma ductal pouco diferenciado; TNM = pT3pN1M0). O laudo histopatológico do paciente 12 identificou um tumor com 4,0 cm no maior eixo, histologicamente classificado como adenocarcinoma ductal com margens de ressecção cirúrgica proximal e circunferencial livres de neoplasia e metástase para cinco (05) de um total de vinte e sete (27) linfonodos regionais dissecados (05/27).

Após a coleta, as amostras cirúrgicas foram transportadas para o biotério de produção e experimentação animal do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ-USP), onde foram processadas e xenoenxertadas no espaço subcutâneo de camundongos nus atímicos (BALB/c nus). Nas semanas seguintes aos implantes, PDXs e camundongos de controle (n = 6 por grupo) foram monitorados para verificar o crescimento do tumor, bem como sua saúde geral. Os experimentos envolvendo animais foram realizados de acordo com as normas éticas de pesquisa com animais adotadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), sob protocolo aprovado (Certificado nº 132/2019) (Apêndice B) pela Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ-USP).

3.2.2. Animais

Foram utilizados camundongos atímicos nude (BALB/c nude) fornecidos pelo biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). Durante todo o período experimental, os animais foram mantidos sob condições SPF (*specific pathogen-free*) com temperatura ambiente controlada entre 20 a 24°C e, ciclo claro-escuro invertido 12-12h, com início da fase escura às 6h e início da fase clara às 18h. Água e ração foram administradas *ad libitum*.

3.2.3. Tratamento

Os camundongos que receberam tratamento foram inoculados por via intraperitoneal com uma solução de 1 µg de Bj-PRO-10c por grama de peso corporal

a cada 72h, enquanto os controles receberam solução salina no mesmo volume. A dose de Bj-PRO-10c foi escolhida com base em nossos estudos anteriores em animais com caquexia induzida por neuroblastoma, que foi bem tolerada e desencadeou efeito anticatabólico, sendo, portanto, considerada adequada para a tradução.

3.2.4. Xenotransplantes

Amostras de tecido fresco de adenocarcinoma ductal pancreático, concedidos com consentimento esclarecido de pacientes submetidos à pancreatectomia, duodenopancreatectomia ou extirpação de metástases, foram obtidos por intermédio do colaborador do projeto, Prof. Dr. Eduardo Reis do IQ-USP, professor do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ-USP) e que realiza procedimentos cirúrgicos nas instituições coparticipantes do projeto. Após a coleta, cada amostra cirúrgica foi transportada até o Biotério de Produção e Experimentação do IQ-USP, onde foi processada e enxertada no espaço subcutâneo de camundongos nude, de acordo com procedimentos descritos na literatura (Morton e Houghton, 2007; Kim et al., 2009; Calles et al., 2013). As cirurgias foram realizadas em condições assépticas, em câmara de fluxo laminar e com instrumentos cirúrgicos autoclavados. Para aumentar as chances de sucesso, cada tumor foi implantado em múltiplos receptores (3 animais, em geral). Para a implantação do tumor, cada camundongo foi pesado e anestesiado com um coquetel de cetamina / xilazina na dose de 100 mg / kg e 20 mg / kg, respectivamente. Já sob o efeito da anestesia, o animal foi colocado em decúbito lateral e o lado direito do corpo, da base do pescoço até a cauda, foi limpo com uma gaze embebida em etanol a 70%. Com uma tesoura pequena, foi feita na pele do flanco uma incisão de cerca de 1 cm. Utilizando as pontas da tesoura, introduzida no espaço subcutâneo, a pele foi gentilmente divulsionada até a formação de um pequeno “bolso”, sendo então depositados nesse espaço, sobre o tecido muscular subjacente, 5 a 10 fragmentos de tumor (quantidade variável em função do tamanho da peça recebida), com 1 a 3 mm³ cada um. Por fim, a pele foi suturada e desinfetada com uma solução antisséptica de iodopovidona, e o animal colocado sob uma lâmpada de aquecimento para impedir a hipotermia durante o período de recuperação

do efeito anestésico. Ao longo das semanas subsequentes aos implantes, os camundongos foram monitorados para a verificação do crescimento dos tumores, assim como de suas condições gerais de saúde.

3.2.5. Manutenção dos xenotransplantes

Para as amostras de PDA em que o xenotransplante foi bem-sucedido, os tumores expandidos foram removidos e reimplantados em sucessivas gerações de camundongos receptores (F1, F2, F3...), de modo a permitir sua manutenção e expansão. Para o reimplante, quando o nódulo subcutâneo atingiu um diâmetro máximo de 2 cm, o animal portador foi eutanasiado sob anestesia geral seguida de deslocamento cervical e transferido para uma cabine de fluxo laminar, onde o xenotumor foi dissecado, lavado em RPMI-1640 sem soro e, com o auxílio de um bisturi, dividido em pequenos fragmentos (1 a 3 mm³). Conforme descrito anteriormente, os fragmentos foram reimplantados em novos camundongos *nude* (3 animais, em geral). O tecido tumoral excedente, não utilizado no transplante, foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido e posteriormente armazenado em freezer a -80°C.

3.2.6. Monitoramento animal

1. O peso corporal dos camundongos e o tamanho do tumor foram monitorados a cada 72h. Além da evolução do peso corporal, foi calculado o ganho de peso corporal através da diferença entre o peso corporal final e o peso corporal inicial (variação do peso corporal). O crescimento dos tumores foi acompanhado através de medições com paquímetro, utilizando a fórmula elipsoidal modificada (Euhus et al., 1986; Tomayko e Reynolds, 1989) (Equação 1):

$$Volume = \frac{1}{2} (\text{comprimento} \times \text{largura}^2)$$

2. O consumo de alimentos foi avaliado pela quantidade de comida consumida, dividida pelo número de animais na gaiola e o número de dias (Jourdain et al., 2018).

3. Os camundongos foram examinados em teste de campo aberto (*Open Field Test - OFT*) para medição da atividade de locomoção. A cada duas semanas, os camundongos foram gentilmente transferidos para um novo ambiente (caixa de poliestireno branco, 50 cm de largura x 50 cm de comprimento) e seu comportamento espontâneo foi filmado durante um ensaio de 5 minutos usando uma câmera posicionada acima da caixa. Os dados comportamentais da atividade locomotora, que incluíram distância total percorrida, tempo total imóvel, percurso percorrido e tempo gasto em cada região da caixa, foram analisados a partir dos arquivos de vídeo através de um software de rastreamento de vídeo (ANY-maze Version 6.33, Stoelting, CO, EUA).

3.2.7. Teste de suspensão de quatro membros

Os camundongos foram colocados sobre a superfície de uma malha quadriculada (1x1 cm) de alumínio e colocada a 35 cm de altura de uma cama macia para garantir uma aterrissagem suave. Adicionalmente, foi permitido que os camundongos se acomodassem a este ambiente por 5 segundos antes que a malha fosse invertida. Em cada período de suspensão, o experimento se iniciava quando o animal apresentava todas as quatro patas segurando a tela. Foi permitido aos camundongos que ficassem pendurados por tempo ilimitado até o momento que as quatro patas se soltassem da grade. O experimento foi realizado a cada 15 dias.

O tempo de suspensão (TS) foi definido como a quantidade de tempo que o camundongo leva para cair da tela invertida. Posto que o tempo de espera foi medido a partir do momento em que a tela é invertida até o momento em que o animal cai da grade (determinado visualmente e mensurado através de um cronômetro). De forma complementar, foi calculado o impulso de retenção (IR) associado ao teste de retenção como sendo igual ao tempo de espera multiplicado pelo peso corporal obtido pouco antes do teste (gm.segundo ou Newtons.segundo; fator de conversão - 9.806×10^{-3} Newtons/gm) (Equação 2):

Impulso de Retenção = Massa Corporal \times Tempo de Suspensão

3.2.8. Eutanásia e coletas

Ao final do protocolo experimental, os animais foram eutanasiados sob anestesia geral seguida de deslocamento cervical com posterior pesagem em balança digital. Para as análises histológicas, os tecidos (fígado, coração, baço, rins, pulmões e cérebro) foram coletados e congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C . Os músculos esqueléticos gastrocnêmio e tibial anterior foram dissecados para analisar a expressão das proteínas relacionadas à degeneração muscular. Os tumores também foram coletados para comparar camundongos caquéticos e não-caquéticos. Após o procedimento de coleta, as carcaças foram congeladas e armazenadas no biotério para posterior incineração realizada por empresa especializada.

3.2.8. Real Time PCR

A expressão gênica foi determinada por PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR). Os tecidos foram homogeneizados em TRIzol (15596026, Invitrogen) e o RNA total foi isolado. O cDNA foi sintetizado usando o kit de síntese de cDNA de fita única RevertAid (K1622, Thermo Fisher Scientific). O qRT-PCR foi realizado usando o Fast SYBR™ Green Master Mix (4385614, Applied Biosystems) e o sistema de PCR em tempo real StepOne Plus (Applied Biosystems). Os genes de catabolismo muscular (Muscle Atrophy F-box, MAFbx/Atrogin-1 e Muscle-specific RING finger 1, MuRF-1) e genes termogênicos de tecido adiposo (proteína desacopladora 1, Ucp1) foram comparados entre camundongos com tumor e controles livres de tumor por qRT-PCR e normalizados ao genes de controle. Os dados foram obtidos a partir de tecidos coletados de pelo menos 4 animais diferentes de cada grupo, medidos em triplicata. Os resultados foram analisados utilizando o método $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ para quantificação

relativa entre grupos e expressos como a média e o desvio padrão (Livak et al., 2001). As sequências dos primers aparecem na Tabela 2.

Tabela 2 – Sequência dos *primers* utilizados na análise qRT - PCR.

Gene	Espécie	Forward	Reverse
<i>RLP-19</i>	Mouse	GCATAGGGAAGAGGAAGGGT	GGCTGTGATACATATGGCGG
<i>MuRF1</i>	Mouse	CATCAAGAGCATTGTAGAAGCC	GCGTGTCTCACTCATCTCCT
<i>Atrogin-1</i>	Mouse	GTTCAAAAAGGAAGTACGAAGGA	GGTCTTCAAGAACTTTTCAGTACC
<i>UCP1</i>	Mouse	AGCAGACATCATCACCTTCC	TTCGGCAATCCTTCTGTCTT

3.2.9. Análise estatística

As diferenças estatísticas foram realizadas utilizando o método apropriado para cada experimento seguidos de testes post-hoc, conforme especificado em cada figura, sendo considerado significativo quando $P < 0,05$, utilizando o software GraphPad Prism v.9.

4. RESULTADOS

4.1 Efeito do Bj-PRO-10c na viabilidade de mioblastos

A avaliação do efeito do Bj-PRO-10c na viabilidade celular foi realizada por meio do ensaio de redução de MTT. O princípio do ensaio MTT é a redução do sal de tetrazólio amarelo pelas desidrogenases mitocondriais em cristais de formazan azul (Karakas et al., 2017). Desta forma, a concentração de cristais de formazan pode ser quantificada usando um espectrofotômetro e está diretamente relacionado com o número de células metabolicamente ativas (Wang et al., 2010), sendo assim um bom indicador redox da funcionalidade e viabilidade mitocondrial e celular. Sendo assim, avaliamos se os meios condicionados de células tumorais (PDA08 e MIA PaCa-2) e o tratamento com o Bj-PRO-10c afetam a capacidade de redução do MTT e consequentemente a homeostase mitocondrial dos mioblastos. Como previsto, os meios condicionados das células tumorais resultaram em uma diminuição de cerca de 20% na viabilidade celular em todos os grupos, o que indica uma redução no número de células metabolicamente ativas ($P < 0,01$) (Figura 15). Demonstramos também que o tratamento com Bj-PRO-10c não afeta a viabilidade em nenhuma das condições se comparado com o respectivo grupo que não foi exposto ao peptídeo, indicando que a produção de NO e/ou inibição da formação de angiotensina II induzida pelo Bj-PRO-10c não foi capaz de inibir a morte de células musculares induzida pelo meio condicionado de células de câncer pancreático.

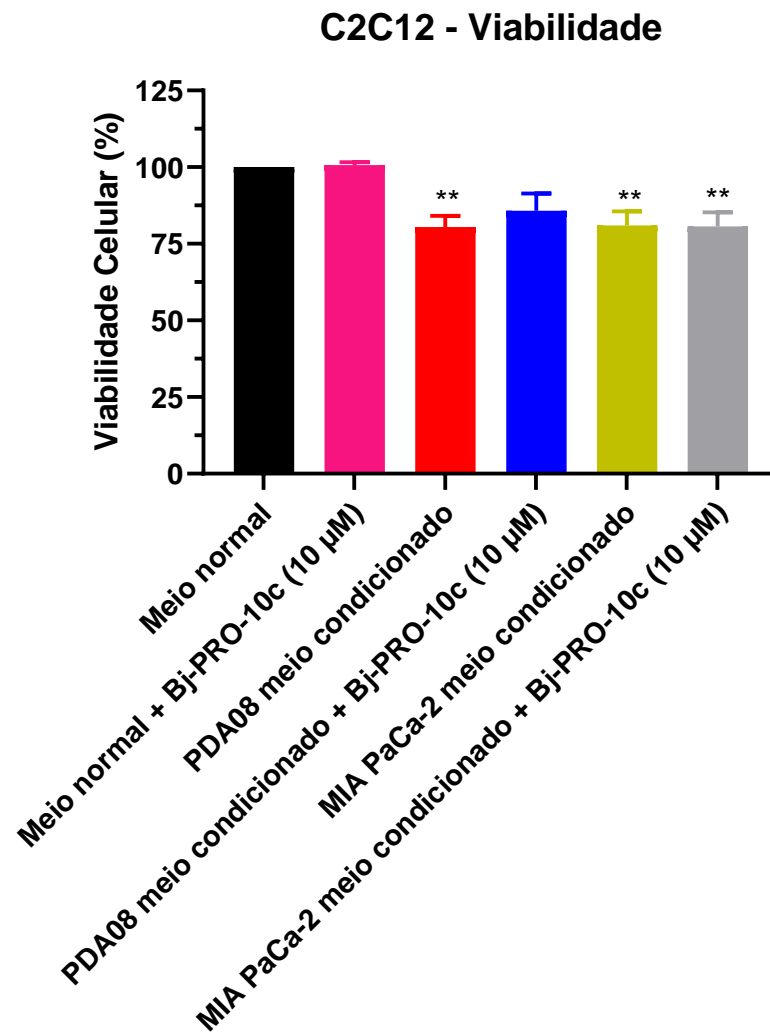
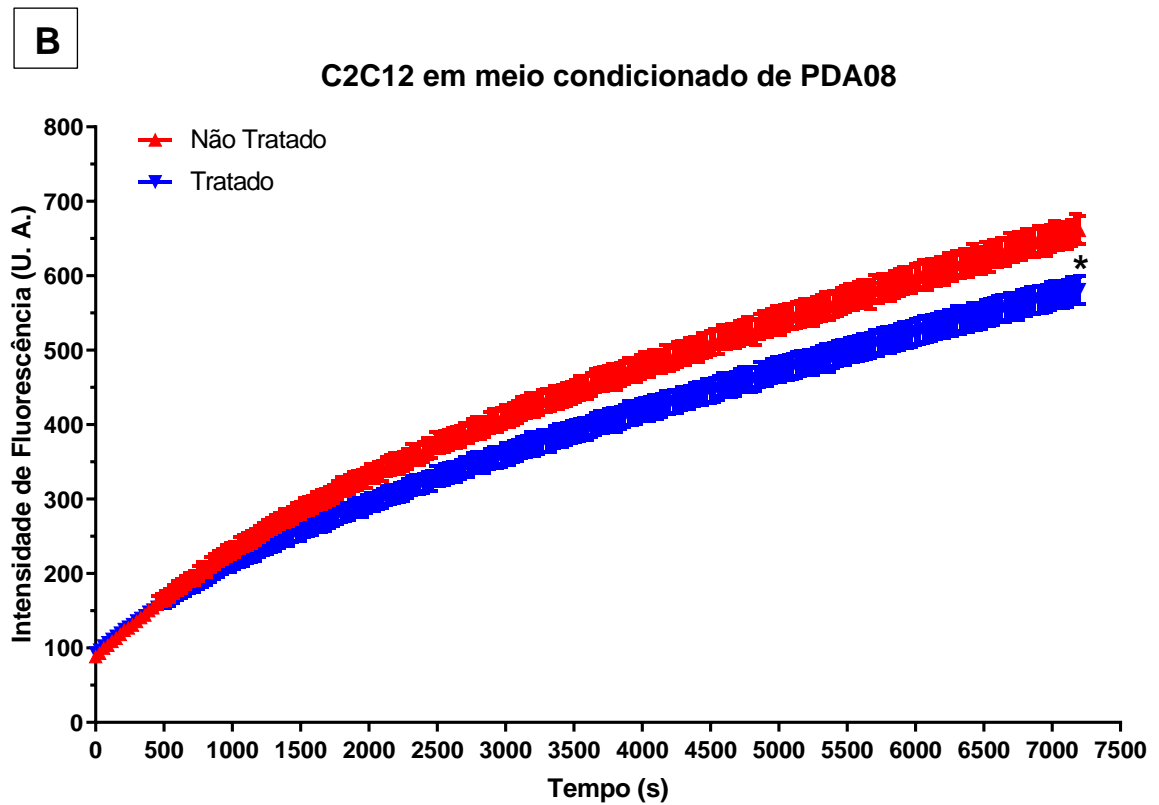
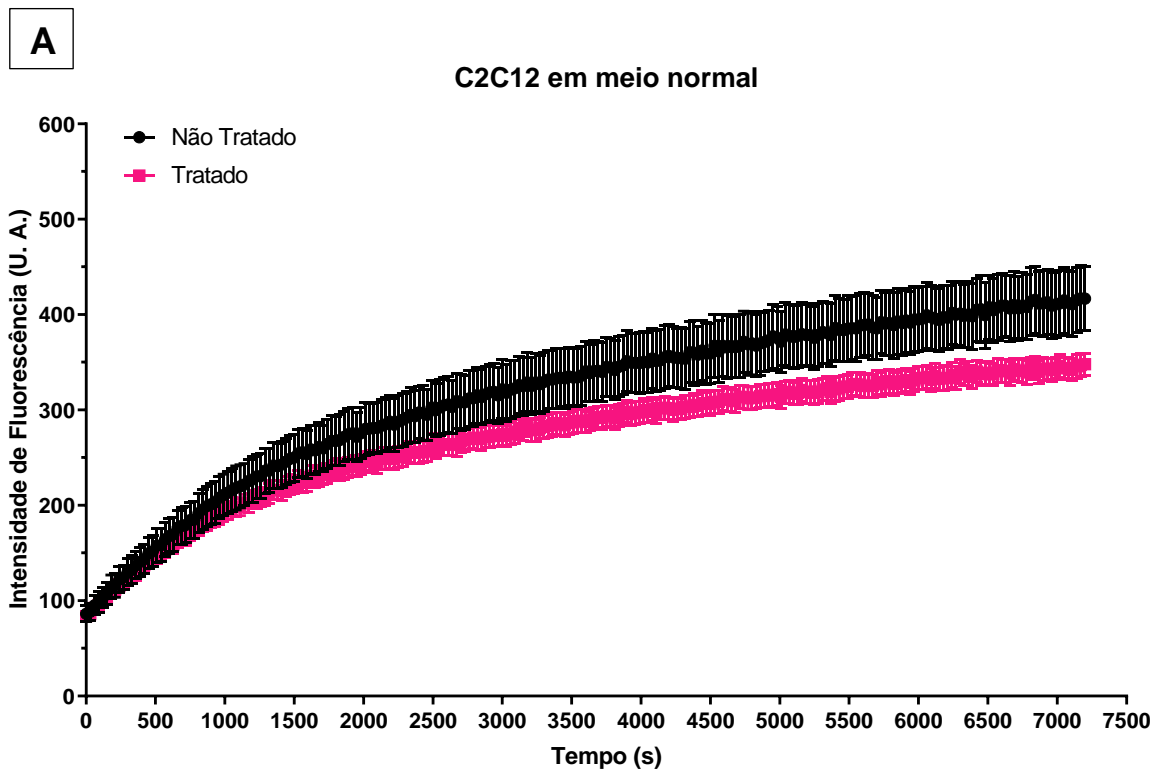


Figura 15: Avaliação da viabilidade celular de mioblastos não diferenciados após o tratamento com Bj-PRO-10c. As células C2C12 foram semeadas em placas para adesão e acompanhadas até que contivessem a quantidade ideal de células em cada colônia para a coloração fosse atingida. As barras representam a média \pm S.E. Os dados dos grupos com meio condicionado foram comparados com o grupo controle em meio comum utilizando two-way ANOVA seguida pelo teste Tukey para comparações múltiplas. Os valores são estatisticamente diferentes do grupo controle em meio comum para * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ ($n = 3$).

4.2. Efeito do Bj-PRO-10c na produção de superóxido

Dado que as espécies reativas desempenham um papel importante no estresse oxidativo, desregulação do equilíbrio anabólico / catabólico, progressão tumoral e na caquexia do câncer, quantificamos a produção de superóxido em mioblastos não diferenciados expostos ao meio comum e meio condicionado de PDA08 ou MIA PaCa-2 na presença ou ausência de Bj-PRO-10c. Foi demonstrado que o Bj-PRO-10c exerce um efeito protetivo contra o estresse oxidativo via redução da expressão de NF- κ B, além de atenuar o dano oxidativo em células de neuroblastoma quando submetidas a exposição de peróxido de hidrogênio (Querobino et al. 2018). Assim, analisamos o potencial antioxidante do Bj-PRO-10c em reduzir a produção de superóxido em células de mioblastos não diferenciados. Ainda que o tratamento não tenha sido eficaz na redução do superóxido de mioblastos que se encontram em condições normais (Figura 16A), como demonstrado nas Figuras 16B-C, o tratamento com Bj-PRO-10c foi capaz de reduzir significativamente a produção de superóxido em células precursoras de mioblastos submetidas ao meio condicionado de células cancerosas. Esses resultados indicam que o Bj-PRO-10c pode ter efeitos protetores contra o estresse oxidativo induzido pelo desenvolvimento da caquexia associada ao câncer de pâncreas.



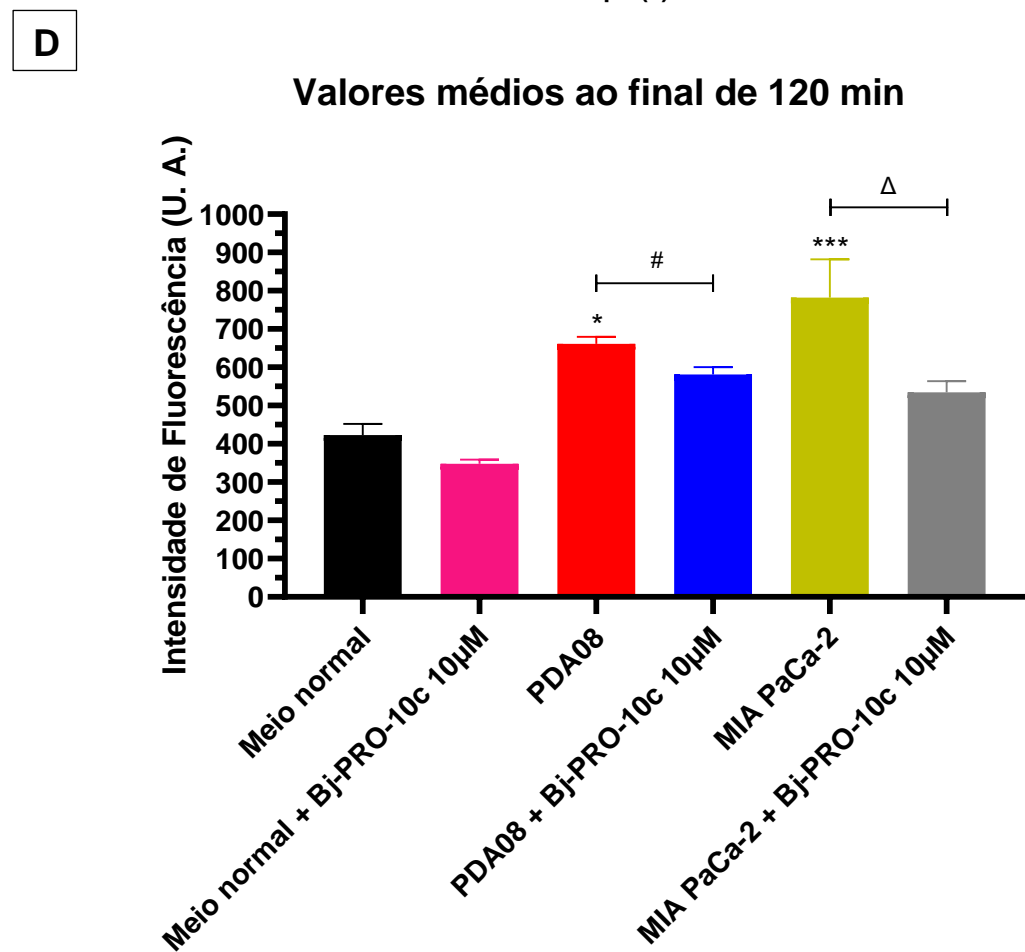
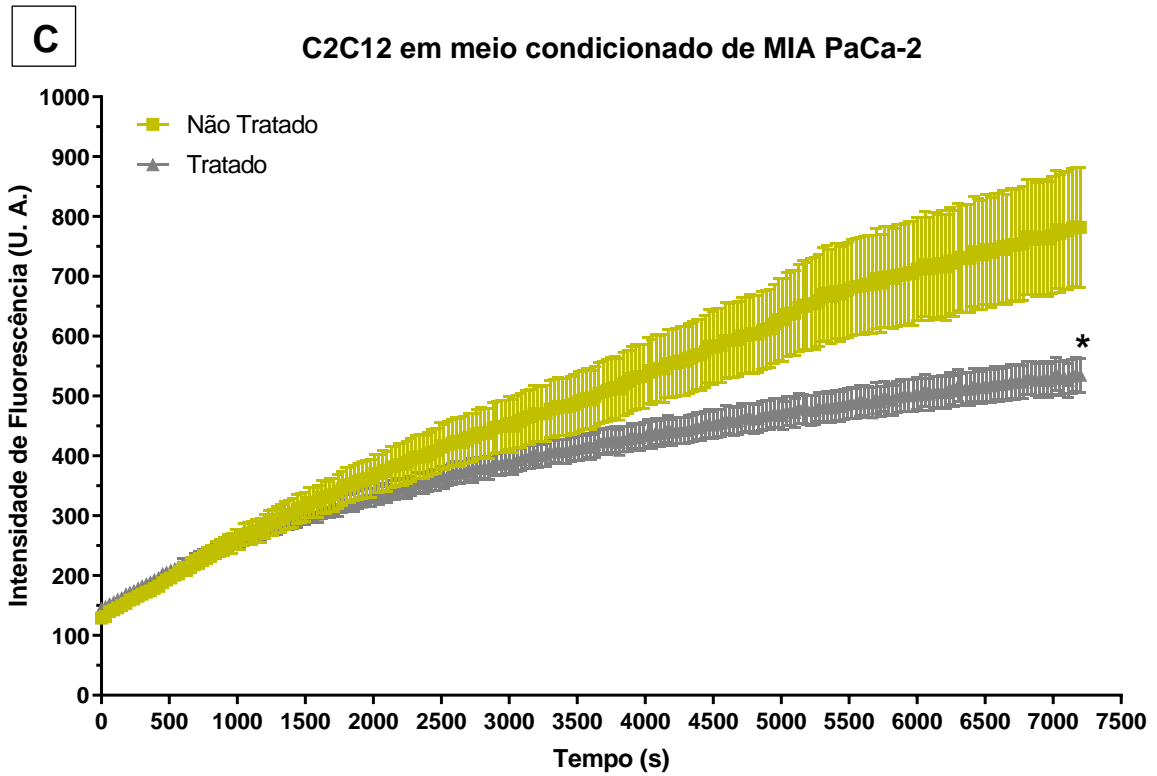


Figura 16: Produção de superóxido em células precursoras de mioblastos expostas ao Bj-PRO-10c. (A) Mioblastos não diferenciados em meio comum, (B) mioblastos não diferenciados em meio condicionado de PDA08 e (C) mioblastos não diferenciados em meio condicionado de MIA PaCa-2 e (D) média de todos os valores ao final de 120 min. As barras representam a média \pm S.E. Os dados foram analisados utilizando two-way ANOVA seguida pelo teste Tukey para comparações múltiplas. * representa diferenças estatisticamente significativas comparado ao grupo controle; # representa diferenças estatisticamente significativas entre o grupo PDA08 e o grupo PDA08 + Bj-PRO-10c e Δ representa diferenças estatisticamente significativas entre o grupo MIA PaCa-2 e o grupo MIA PaCa-2 + Bj-PRO-10c. Os valores são estatisticamente diferentes do controle para * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$. Os valores são estatisticamente diferentes do grupo PDA para # $P < 0,05$. Os valores são estatisticamente diferentes do grupo MIA PaCa-2 para $\Delta P < 0,05$ ($n = 3$).

4.3. Geração de xenotransplantes

Entre 2015 e 2017, através do grupo de pesquisa do colaborador do projeto, Prof. Dr. Eduardo Reis; professor do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ-USP), foram coletadas amostras de 18 pacientes com adenocarcinoma ductal pancreático (PDA), sendo 16 provenientes de tumores primários e 2 de metástases hepáticas (Tabela 3). De 17 amostras de tumor implantadas em camundongos imunodeficientes, 7 cresceram nos camundongos receptores, representando uma taxa de sucesso de 41% (7/17). Os PDXs estabelecidos foram mantidos por passagens sucessivas em novos camundongos receptores, com tempo de latência para a formação de nódulos palpáveis variando entre 2 e 4 meses, atingindo a geração F11.

Tabela 3 – Amostras de PDA coletadas para a geração de PDXs.

Paciente	Sexo	Idade	Tipo de tumor
P01	M	83	Metástase hepática
P02	F	62	Tumor primário
P03	F	44	Metástase hepática
P04	F	67	Tumor primário
P05	F	69	Tumor primário
P06	F	71	Tumor primário
P07	M	73	Tumor primário
P08	F	74	Tumor primário
P09	M	61	Tumor primário
P10	F	64	Tumor primário
P11	F	74	Tumor primário
P12	M	45	Tumor primário
P13	F	69	Tumor primário
P14	M	68	Tumor primário
P15	F	78	Tumor primário
P16	F	67	Tumor primário
P17	M	67	Tumor primário
P18	F	80	Tumor primário

Dentre os tumores que foram transplantados com sucesso, constatamos que alguns camundongos apresentavam perda de peso significativa (P04, P07 e P08) durante o período de latência do tumor, sugerindo o desenvolvimento de um estado caquético. Contudo, outros camundongos apresentaram variação positiva no peso final (P02, P09, P12 e P17). Esses dados sugeriram que a perda de peso não se devia

a fisiologia dos animais utilizados, mas sim a características intrínsecas ao PDX. Adicionalmente, os dados propõem que a variação de peso não se correlacionada com o tamanho do tumor (Figura 17).

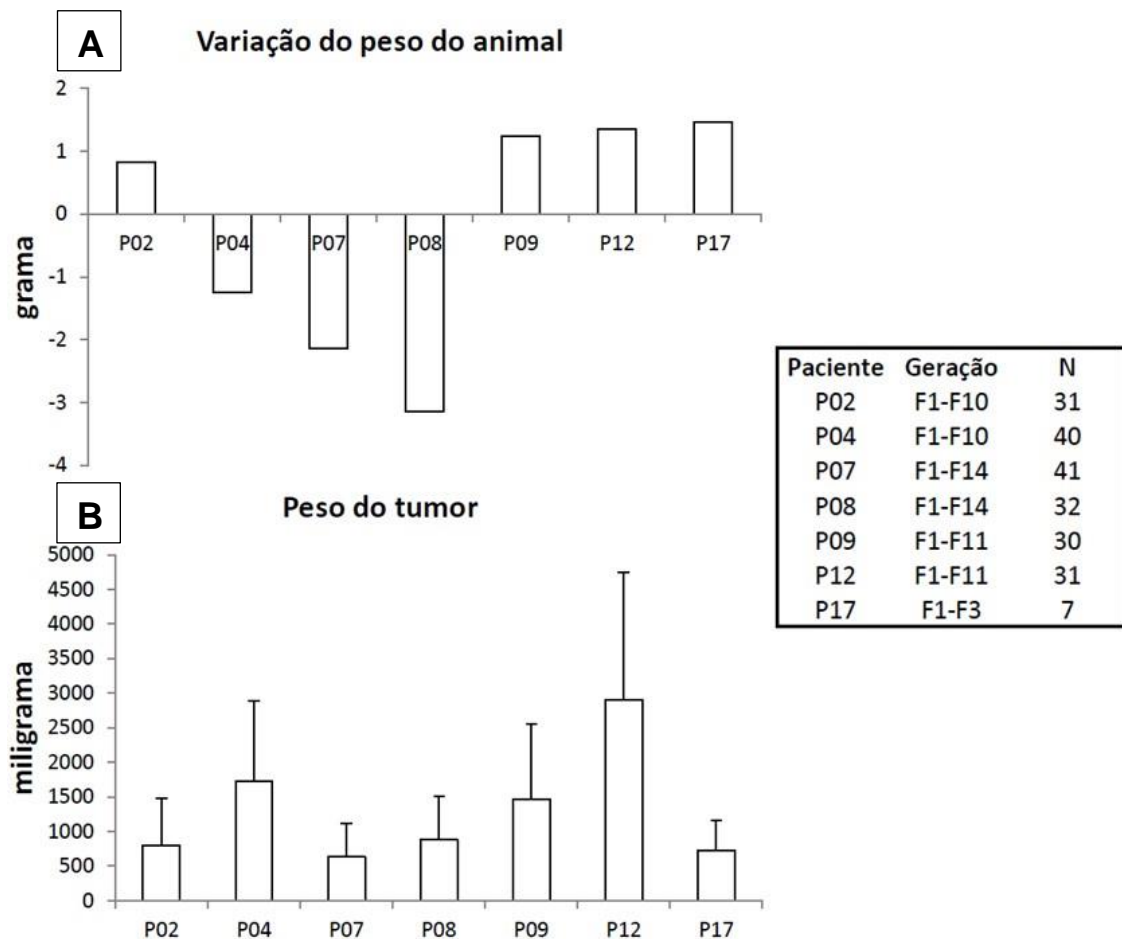


Figura 17: Heterogeneidade clínica em camundongos transplantados com PDA oriundos de pacientes diferentes. (A) Variação total do peso corporal e **(B)** peso final do tumor no dia da necrópsia. Os dados apresentados, referentes ao período de 2015 a 2017, foram compilados pelo grupo de pesquisa liderado pelo colaborador do projeto, o Prof. Dr. Eduardo Reis, docente no Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ-USP). Nesse estudo, foram coletadas amostras de tecido de 18 pacientes diagnosticados com adenocarcinoma ductal pancreático (PDA), sendo 16 destas provenientes de tumores primários e 2 de metástases hepáticas, como documentado na Tabela 3. Dados não publicados.

Como abordado na introdução, a heterogeneidade da caquexia do câncer pancreático pode resultar de diferenças entre tumores que induzem as mesmas neoplasias. Dessa forma, com o objetivo de mimetizar a heterogeneidade caquética, selecionamos dois tumores de PDA humanos provenientes dos pacientes 08 (P08) (n = 32) e paciente 12 (P12) (n = 31) e transplantamos subcutaneamente em camundongos *nude*. Os camundongos foram separados em 4 grupos, de acordo com a origem do tumor e submetidos ou não ao tratamento com Bj-PRO-10c (1µg de Bj-PRO-10c por grama de peso corporal a cada 72h). Também foram empregados grupos de animais controle (não portadores de tumor) para que os dados dos animais com tumor fossem comparados aos parâmetros de animais saudáveis. A nomenclatura de cada grupo experimental está descrita na Tabela 4.

Tabela 4 – Grupos experimentais para caracterização do modelo de caquexia baseado em PDX e avaliação do potencial terapêutico do Bj-PRO-10c.

Origem do tumor	Tratamento com Bj-PRO-10c	Nomenclatura
Não portador	Não	Controle
Paciente 08	Não	PDX08 - NT
Paciente 08	Sim	PDX08 - T
Paciente 12	Não	PDX12 - NT
Paciente 12	Sim	PDX12 - T

4.4. Peso corporal

A fim de avaliar o papel do PDA na indução da caquexia *in vivo*, o peso corporal dos animais foi monitorado a cada 72h desde a inoculação dos xenotumores até sexagésimo dia após o transplante. Adicionalmente, foi calculado o ganho de peso corporal através da diferença entre o peso corporal aferido no dia da medição e o peso

corporal inicial (variação do peso corporal). Da mesma forma, o crescimento dos tumores foi acompanhado a cada 72h através de medições com paquímetro.

Os dois modelos de camundongos transplantados com PDA exibiram diferenças expressivas quanto a evolução do peso corporal. Ao final de 60 dias, enquanto grupo controle ganhou $5,05 \pm 0,66$ g de peso corporal total, os camundongos do grupo PDX08 - NT praticamente mantiveram seu peso inicial. Os camundongos PDX08 - T que receberam tratamento crônico com Bj-PRO-10c, via intraperitoneal com uma solução de 1 μ g de Bj-PRO-10c por grama de peso corporal a cada 72h, apresentaram um aumento inicial do peso corporal e o mantiveram praticamente estável durante todo o restante do período experimental, com ganho final de $1,73 \pm 0,34$ g (Figura 18A). Surpreendentemente, os camundongos PDX12 exibiram ganho de peso corporal similar ao grupo controle, com ganhos de $6,63 \pm 0,88$ para o grupo PDX12 - NT e $6,00 \pm 0,82$ g para o PDX12 - T, contudo, o tratamento com o peptídeo nesses animais não demonstrou alterar significativamente esse comportamento (Figura 18B). Em linhas gerais, os camundongos PDX08 ficaram muito mais debilitados após 60 dias de experimento do que se comparados com o grupo PDX12, que não demonstrou nenhuma depleção visual aparente (Figura 19 e Figura 20).

Dado que os animais transplantados com PDA ganham peso com o crescimento do tumor enquanto perdem peso com o catabolismo do tecido, o desenvolvimento do tumor pode camuflar o definhamento progressivo nos estágios iniciais e intermediários da caquexia. Para monitorar a evolução do peso corporal progressivo livre de tumor, o volume do tumor de cada animal foi estimado através da fórmula elipsoidal modificada (Equação 1) e subtraído do peso corporal total que o animal apresentava no dia da respectiva medição (Figura 21A e Figura 21B). Em contraste com os dados anteriores, os camundongos transplantados com PDX08 - NT exibiram declínio progressivo do peso corporal livre de tumor. Além de apresentar menor variação de peso corporal, a perda de peso dos animais PDX08 - T apenas se torna negativa a partir do 44^o dia de experimento, em contraste com os camundongos PDX08 - NT que apresentam redução pronunciada e que se torna negativa a partir do 19^o dia.

Embora os pacientes possam apresentar caquexia ao longo do curso de sua doença, a incidência de caquexia tende a ser mais pronunciada no estágio refratário.

A variação do peso corporal final livre de tumor é definida como a medição do peso corporal final menos a massa tumoral na necropsia. Enquanto o grupo controle ganhou $5,05 \pm 0,66$ g de peso corporal ao longo de 60 dias, os camundongos do grupo PD08 - NT e PDX08 - T perderam $3,70 \pm 0,90$ e $0,95 \pm 0,16$ g de peso corporal livre de tumor ($P < 0,01$), respectivamente. Já o modelo PDX12 exibiu ganho de peso corporal livre de tumor de $4,85 \pm 0,41$ para o grupo PDX12 - NT e $3,62 \pm 0,31$ para o PDX12 - T ($P < 0,05$) (Figura 22).

Tendo em vista que os camundongos dos grupos PDX08 apresentaram pesos corporais inferiores em relação aos seus controles de ninhada, avaliamos o comprimento da tíbia para determinar se o peso reduzido é devido a uma falha no crescimento. Demonstramos que todos os grupos de camundongos portadores de PDA apresentaram comprimentos de tíbia semelhantes em relação ao seu controle de ninhada (Figura 23A-B) ($P > 0,05$).

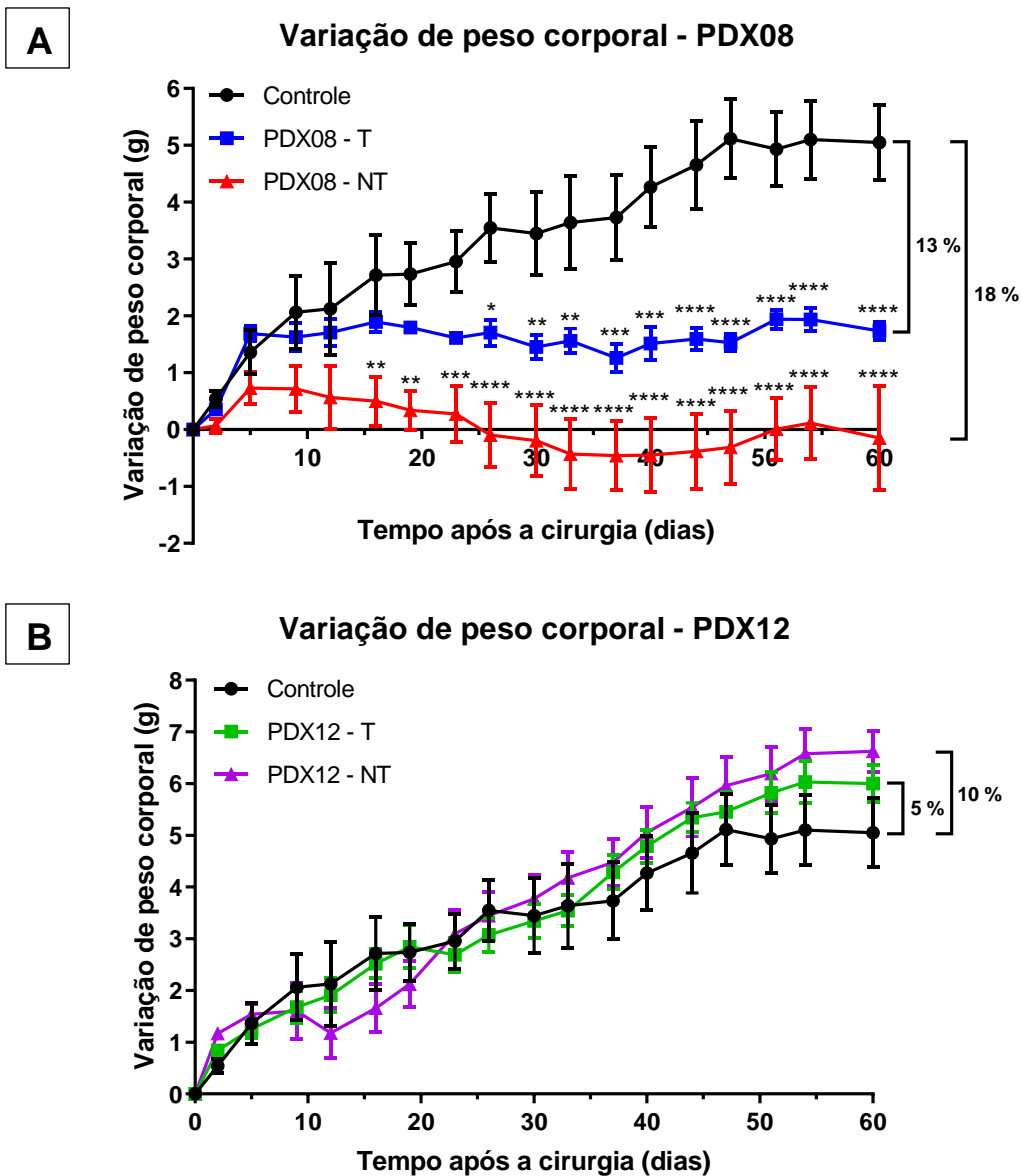


Figura 18: Efeito sistêmico dos tumores xenográficos na variação do peso corporal. (A) Variação do peso corporal no grupo PDX08 e **(B)** variação do peso corporal no grupo PDX12. Legenda: Controle – camundongos saudáveis livres de tumor; NT (não tratados) – camundongos que foram submetidos ao transplante de PDA e que não receberam tratamento com Bj-PRO-10c; T (tratados) – camundongos que foram submetidos ao transplante de PDA e que receberam tratamento com Bj-PRO-10c (1 μ g de Bj-PRO-10c por grama de peso corporal a cada 72h). As barras representam a média \pm S.E. Os dados dos grupos PDX foram comparados com o grupo controle utilizando two-way ANOVA seguida pelo teste Tukey para comparações múltiplas. * representa diferenças estatisticamente significativas comparado ao grupo controle. Os valores são estatisticamente diferentes para * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$ ($n = 4-6$ por grupo).

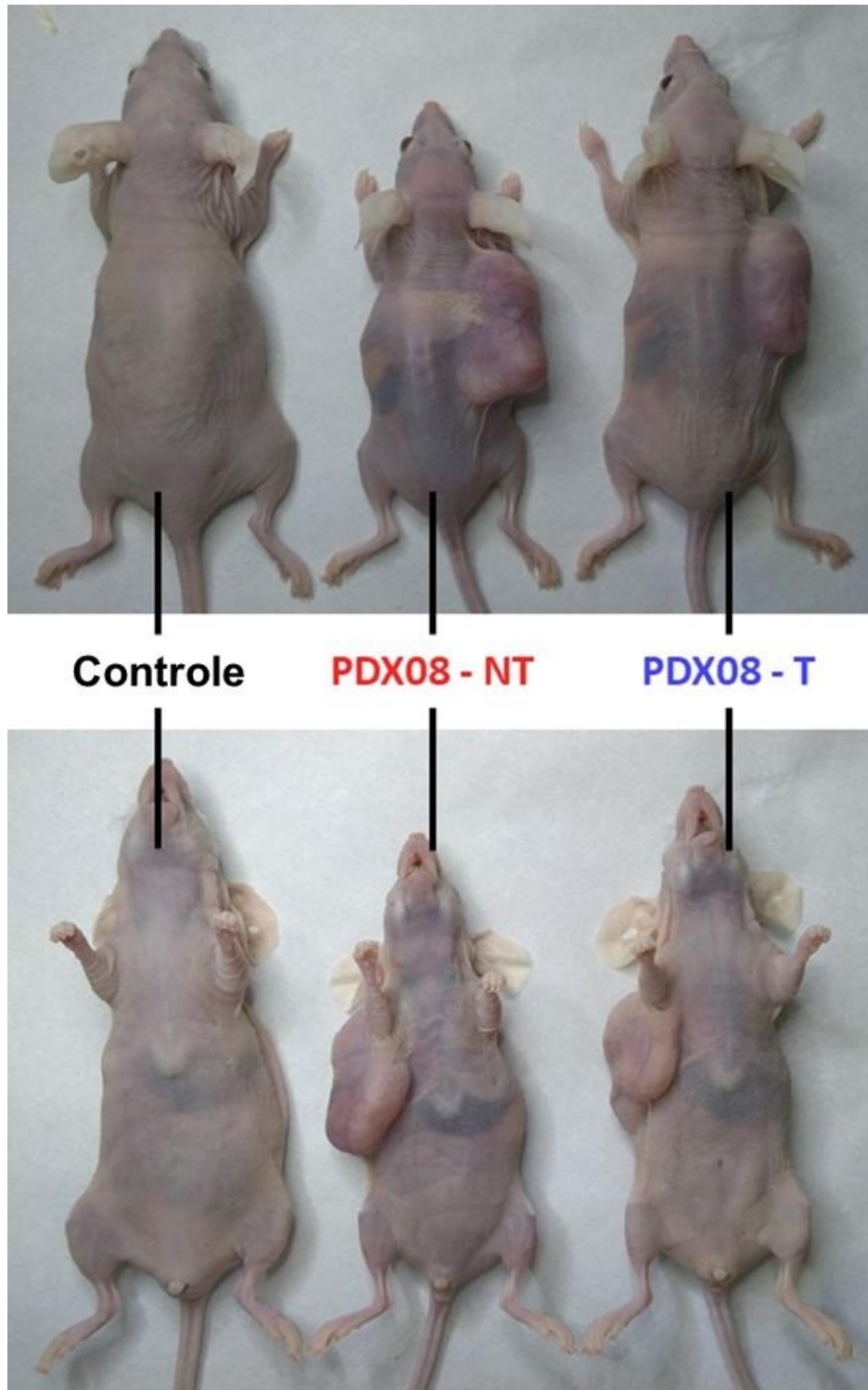


Figura 19: Comparação de animais transplantados com PDX08 em relação ao controle no momento da eutanásia. No grupo PDX08 - NT, os camundongos mostraram evidente depleção visual, com diminuição de tamanho, massa magra e tecido adiposo empobrecidos. Embora o grupo PDX08 - T também tenha exibido depleção corporal em relação ao grupo controle saudável, os camundongos tratados apresentaram uma condição estética visualmente superior em comparação ao grupo não tratado correspondente.

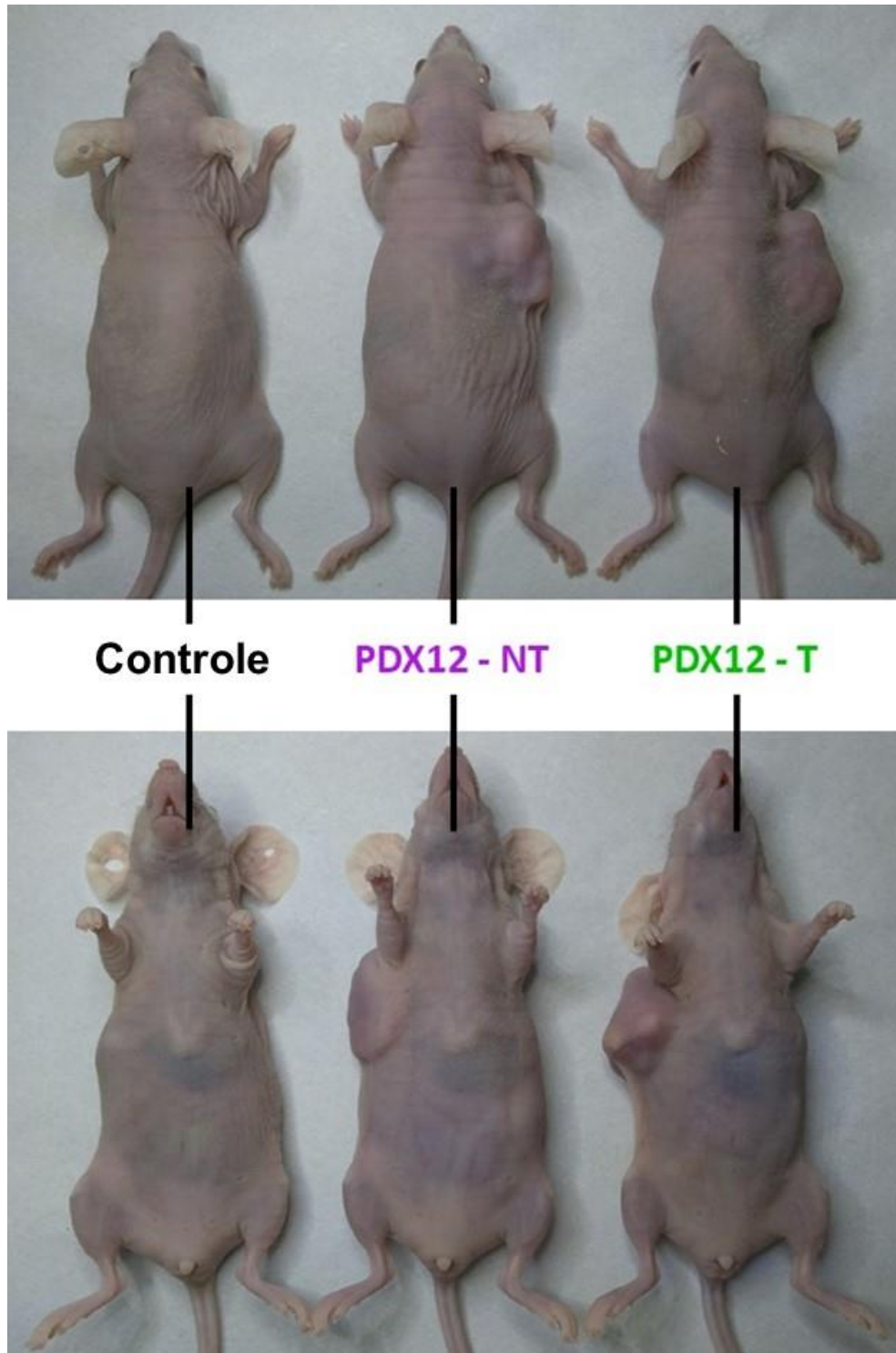


Figura 20: Comparação de animais transplantados com PDX12 em relação ao controle no momento da eutanásia. Ao contrário dos camundongos do grupo PDX08, os animais dos grupos PDX12, tanto tratados quanto não tratados, exibiram uma condição estética saudável e semelhante ao grupo controle de ninhada.

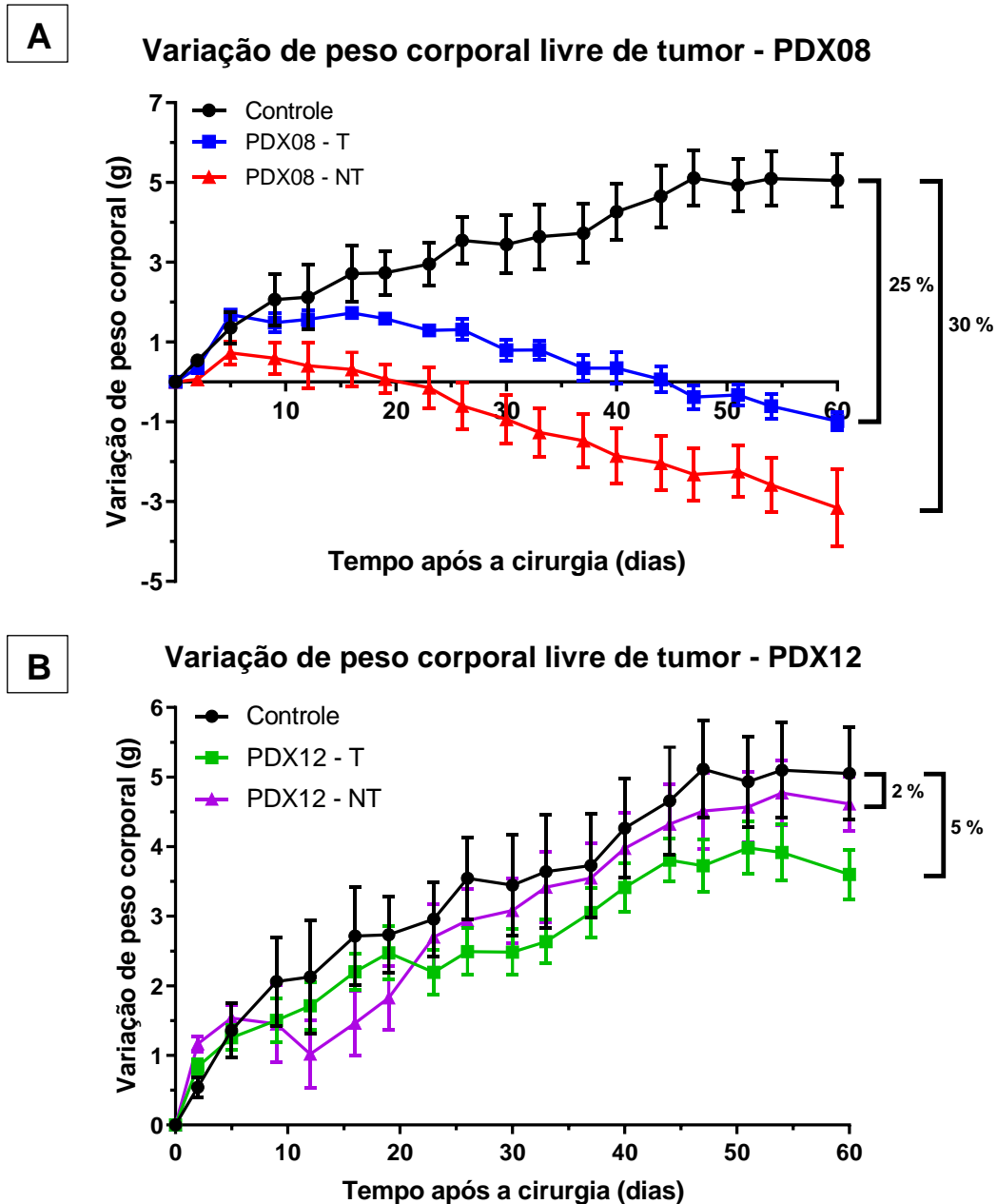


Figura 21: Efeito sistêmico dos tumores xenográficos na variação do peso corporal progressivo livre de tumor. (A) Variação do peso corporal progressivo livre de tumor no grupo PDX08 e (B) variação do peso corporal progressivo livre de tumor no grupo PDX12. Legenda: Controle – camundongos saudáveis livres de tumor; NT (não tratados) – camundongos que foram submetidos ao transplante de PDA e que não receberam tratamento com Bj-PRO-10c; T (tratados) – camundongos que foram submetidos ao transplante de PDA e que receberam tratamento com Bj-PRO-10c (1 μ g de Bj-PRO-10c por grama de peso corporal a cada 72h). As barras representam a média \pm S.E. Os dados dos grupos PDX foram comparados com o grupo controle utilizando two-way ANOVA seguida pelo teste Tukey para comparações múltiplas. Os valores são estatisticamente diferentes do controle para * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$ (n = 4-6 por grupo).

Varição final de peso corporal livre de tumor

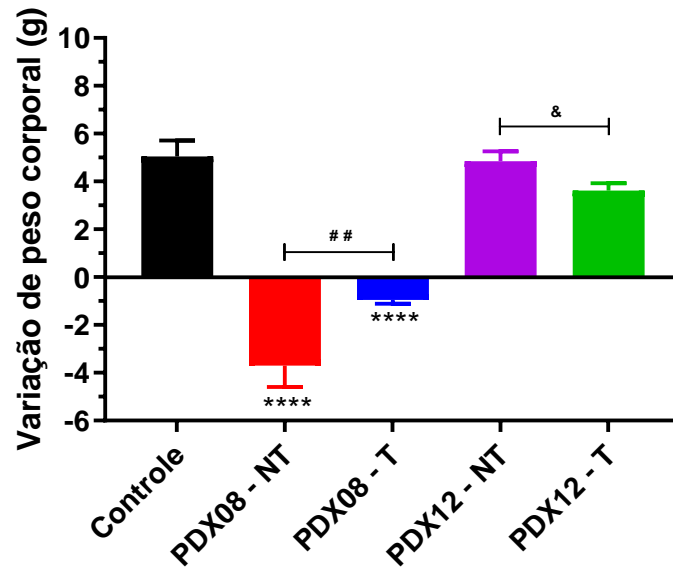


Figura 22: Variação do peso corporal final livre de tumor. Os camundongos foram eutanasiados no dia 60 e, após a remoção do tecido tumoral, as carcaças dos animais foram pesadas em balança digital. Legenda: Controle – camundongos saudáveis livres de tumor; NT (não tratados) – camundongos que foram submetidos ao transplante de PDA e que não receberam tratamento com Bj-PRO-10c; T (tratados) – camundongos que foram submetidos ao transplante de PDA e que receberam tratamento com Bj-PRO-10c (1µg de Bj-PRO-10c por grama de peso corporal a cada 72h). As barras representam a média ± S.E. Os dados dos grupos PDX foram comparados com o grupo controle utilizando one-way ANOVA seguida pelo teste Tukey para comparações múltiplas. * representa diferenças estatisticamente significativas comparado ao grupo controle, # representa diferenças estatisticamente significativas entre o grupo PDX08 - NT e o grupo PDX08 - T e & representa diferenças estatisticamente significativas entre o grupo PDX12 - NT e o grupo PDX12 – T. Os valores são estatisticamente para * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$. Os valores são estatisticamente diferentes para # $P < 0,05$; # $P < 0,01$. Os valores são estatisticamente para & $P < 0,05$ (n = 4-6 por grupo).

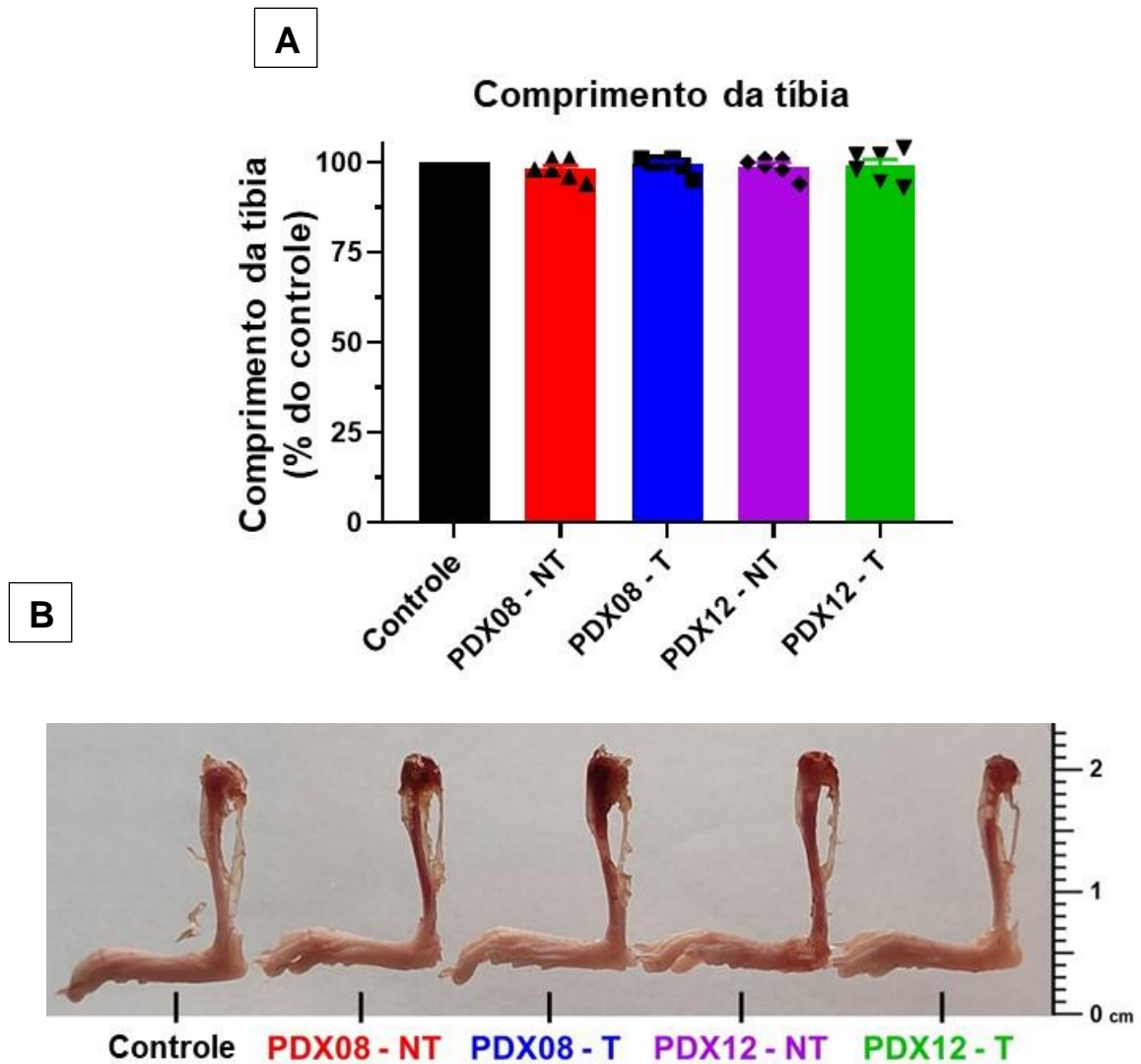


Figura 23: Comprimento de tíbia dos camundongos no momento da eutanásia. (A) Comparação do comprimento da tíbia dos camundongos transplantados com PDA em relação ao grupo controle e **(B)** representação visual da tíbia de animais controle e transplantados com PDA. Os camundongos foram eutanasiados no dia 60 e, após a remoção da tíbia, o comprimento foi determinado com paquímetro. Legenda: Controle – camundongos saudáveis livres de tumor; NT (não tratados) – camundongos que foram submetidos ao transplante de PDA e que não receberam tratamento com Bj-PRO-10c; T (tratados) – camundongos que foram submetidos ao transplante de PDA e que receberam tratamento com Bj-PRO-10c (1 μ g de Bj-PRO-10c por grama de peso corporal a cada 72h). Os dados dos grupos PDX foram comparados com o grupo controle utilizando one-way ANOVA seguida pelo teste Tukey para comparações múltiplas (n = 4-6 por grupo).

4.5. Anorexia e ingestão de alimentos

Dado que pacientes caquéticos frequentemente apresentam anorexia progressiva, o consumo acumulado de alimentos foi avaliado pela quantidade de comida consumida, dividida pelo peso dos animais em cada gaiola. Os dados revelaram que os animais transplantados com PDA não apresentaram redução alimentar significativa em relação ao controle ($P > 0,05$) em nenhum dos períodos analisados (Figura 24).

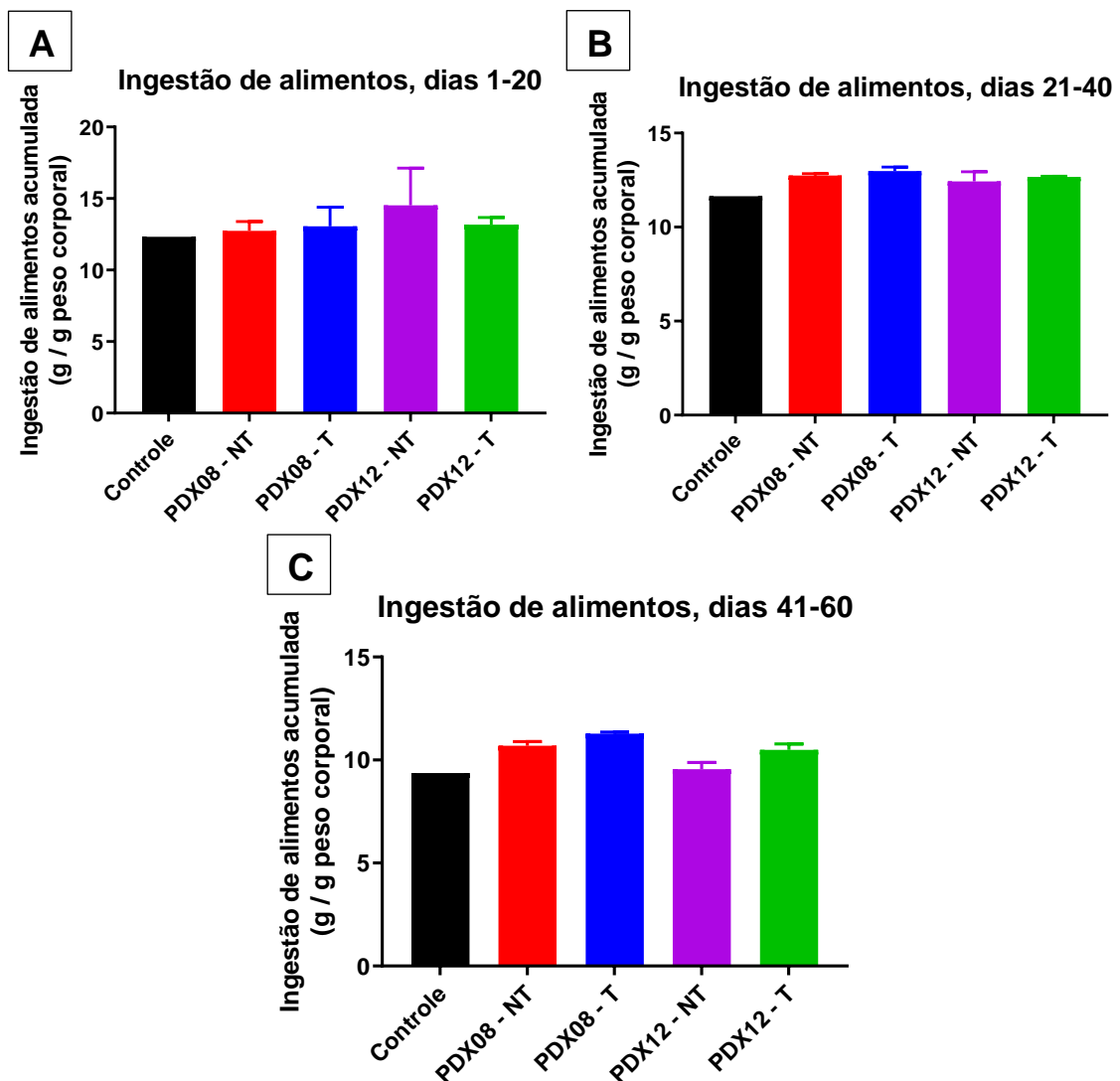


Figura 24: A perda de peso não está associada a diminuição da ingestão de alimentos em animais xenoenxertados com PDA. Ingestão acumulada de alimentos entre os dias (A) 1 - 20, (B) 21 - 40 e (C) 41 - 60. Legenda: Controle – camundongos saudáveis livres de tumor;

NT (não tratados) – camundongos que foram submetidos ao transplante de PDA e que não receberam tratamento com Bj-PRO-10c; T (tratados) – camundongos que foram submetidos ao transplante de PDA e que receberam tratamento com Bj-PRO-10c (1µg de Bj-PRO-10c por grama de peso corporal a cada 72h). As barras representam a média ± S.E. Os dados dos grupos PDX foram comparados com o grupo controle utilizando one-way ANOVA seguida pelo teste Tukey para comparações múltiplas (n = 4-6 por grupo).

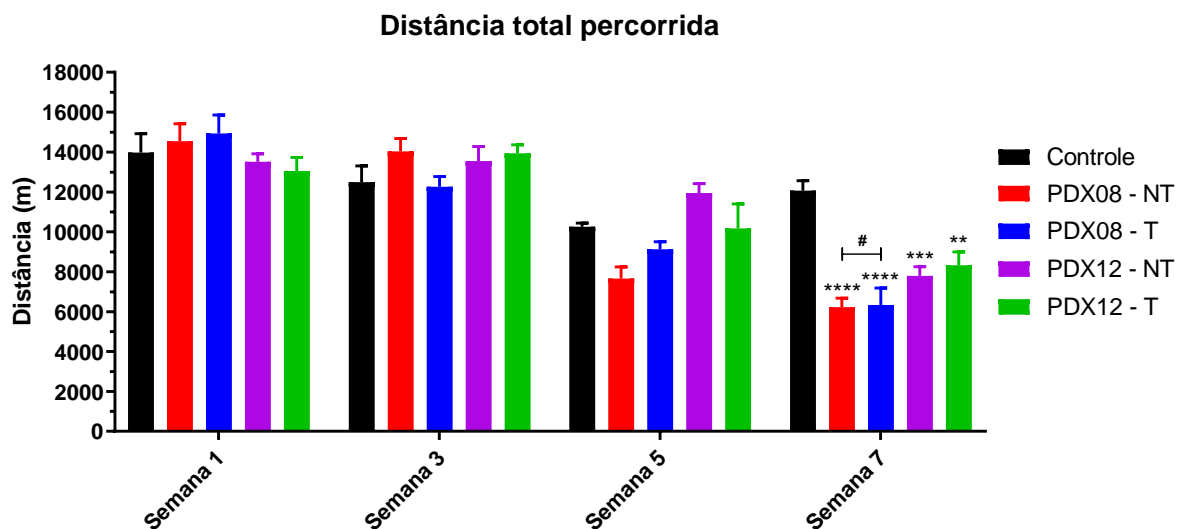
4.6. Testes comportamentais para desempenho locomotor espontâneo

Fadiga e letargia estão entre as manifestações de caquexia mais significativas e menos tratadas terapeuticamente e, portanto, é importante que os modelos de caquexia recapitem essas características. Em alinhamento com este aspecto da caquexia em pacientes com câncer de pâncreas, o desempenho locomotor diminuído é uma manifestação da caquexia induzida por PDA. Os camundongos foram rastreados no teste de campo aberto em blocos de 5 minutos para medir a distância total percorrida, períodos de imobilidade e perfil exploratório. Os resultados da avaliação da atividade locomotora de camundongos portadores de PDA mostraram que não houve diferença significativa na distância total percorrida e nem na duração do tempo imóvel em relação ao grupo controle nas cinco primeiras semanas ($P > 0,05$). Contudo, na sétima semana tanto os camundongos enxertados com PDA do paciente 08 (PDX08) como do 12 (PDX12) mostraram redução na distância total percorrida (Figura 25A) e aumento do tempo imóvel (Figura 25B) quando comparados com o controle. Consistente com isso, os gráficos de rastreamento representativos que mostram o caminho percorrido pelos camundongos indicam diminuição no desempenho locomotor motivado pela progressão do câncer (Figura 25C). Na semana final do experimento, o tratamento se mostrou em aumentar significativamente a distância percorrida apenas no grupo PDX08 - T ($P < 0,05$).

Tendo em vista que o comportamento e tomada de decisão são fatores adicionais envolvidos na progressão da caquexia, os camundongos foram avaliados quanto ao tempo gasto no centro da caixa do campo aberto e tempo gasto na periferia (Figura 26A). Nos modelos comportamentais, os animais são expostos a estímulos externos que podem desencadear comportamentos defensivos e ansiolíticos, sendo

a ansiedade uma resposta ao sentimento de aversão. Nessa avaliação, a permanência em diferentes regiões da caixa está relacionada ao caráter exploratório e automotivado, onde passar mais tempo nas regiões periféricas indica um comportamento defensivo e ansioso. Nas primeiras semanas, não se apresentou efeito significativo em relação ao tempo de permanência no centro e periferia em nenhum dos grupos ($P > 0,05$). Já na semana 7, os camundongos PDX08 e PDX12 começaram a passar mais tempo nas regiões laterais da caixa em comparação com os camundongos controle que permaneciam nas áreas centrais da caixa com frequência muito maior (Figura 26B-C). No entanto, semelhante ao que foi observado nos testes de distância percorrida, o tratamento crônico com o Bj-PRO-10c ao longo dos 60 dias de experimento não foi capaz de promover alterações significativas no comportamento defensivo nos grupos tratados, em nenhum dos períodos analisados ($P > 0,05$).

A



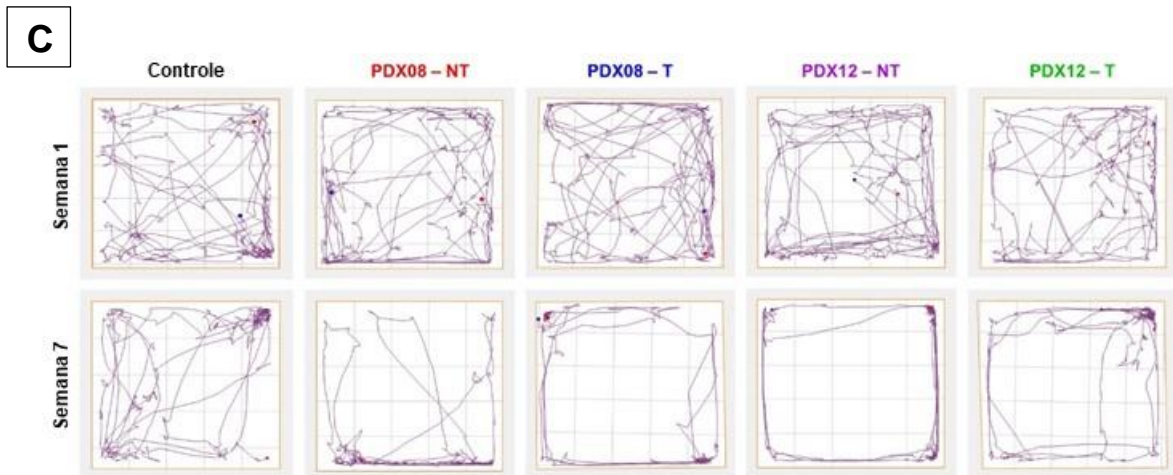
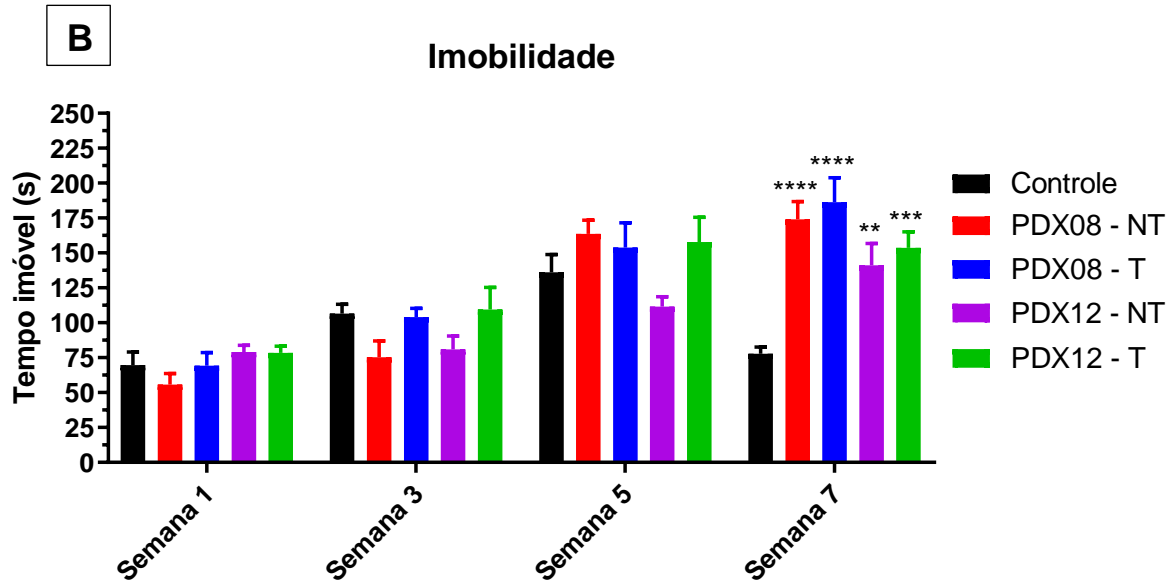
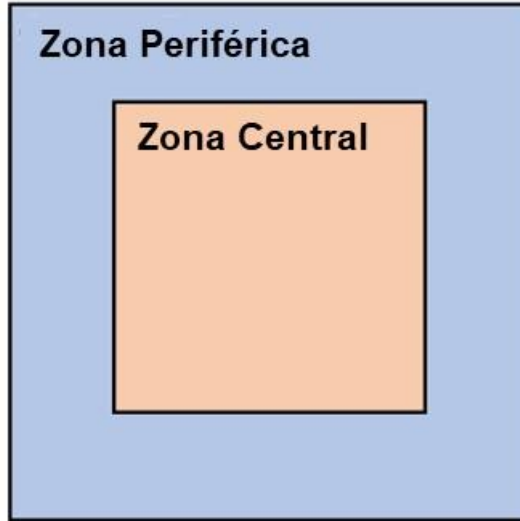
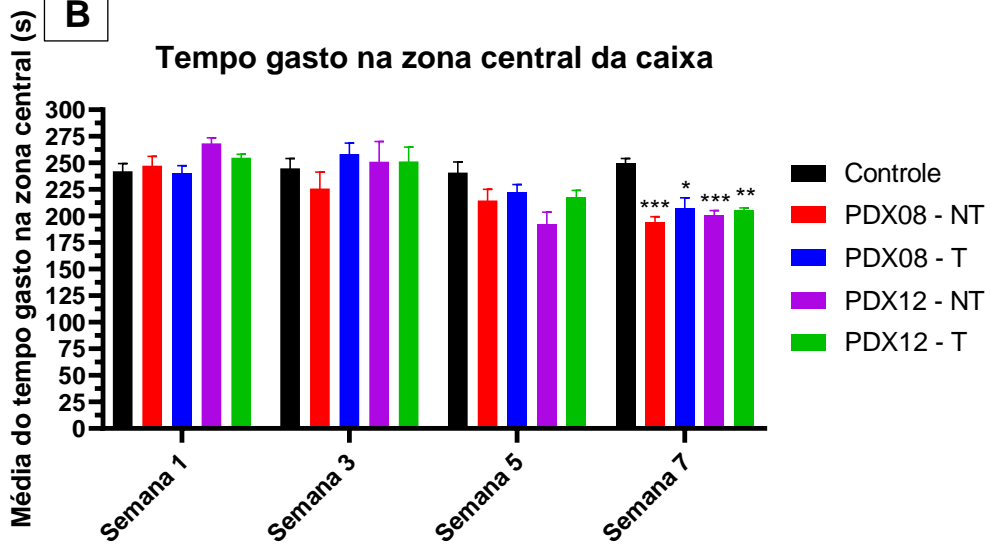


Figura 25: Desempenho locomotor progressivo de camundongos controle e transplantados com PDA na arena de campo aberto durante o teste de 5 min. (A) Distância total percorrida, **(B)** período total imóvel e **(C)** traçados representativos do percurso percorrido. Legenda: Controle – camundongos saudáveis livres de tumor; NT (não tratados) – camundongos que foram submetidos ao transplante de PDA e que não receberam tratamento com Bj-PRO-10c; T (tratados) – camundongos que foram submetidos ao transplante de PDA e que receberam tratamento com Bj-PRO-10c (1µg de Bj-PRO-10c por grama de peso corporal a cada 72h). Os dados dos grupos PDX foram comparados com o grupo controle utilizando two-way ANOVA seguida pelo teste Tukey para comparações múltiplas. Nos gráficos A e B, os valores são estatisticamente diferentes do controle para * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$. Nos gráficos A e B, os valores são estatisticamente diferentes para # $P < 0,05$ (n = 4-6 por grupo).

A



B



C

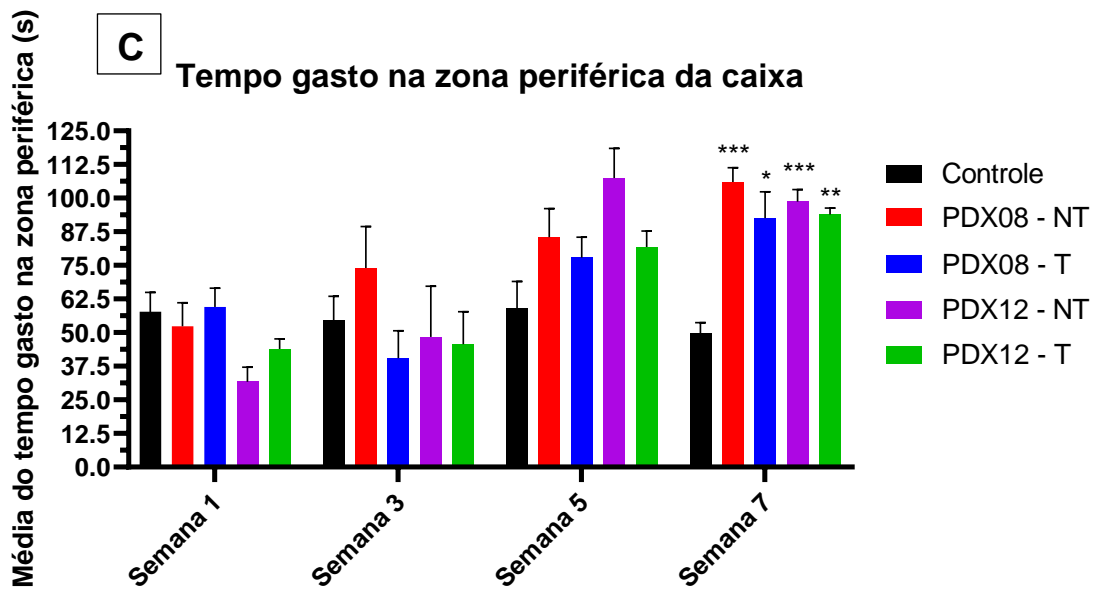


Figura 26: Efeitos de xenotumores PDA em comportamentos ansiolíticos. (A) Representação visual da divisão (zonas de centro e periferia) da caixa utilizada para o teste de campo aberto; **(B)** tempo total gasto na zona central da caixa e **(C)** tempo total gasto na zona periférica da caixa. Legenda: Controle – camundongos saudáveis livres de tumor; NT (não tratados) – camundongos que foram submetidos ao transplante de PDA e que não receberam tratamento com Bj-PRO-10c; T (tratados) – camundongos que foram submetidos ao transplante de PDA e que receberam tratamento com Bj-PRO-10c (1µg de Bj-PRO-10c por grama de peso corporal a cada 72h). As barras representam a média ± S.E. Os dados dos grupos PDX foram comparados com o grupo controle utilizando two-way ANOVA seguida pelo teste Tukey para comparações múltiplas. Nos gráficos B e C, os valores são estatisticamente diferentes do controle para * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$ (n = 4-6 por grupo).

4.7. Teste de suspensão de quatro membros

Com intuito de investigar o comprometimento funcional muscular induzido por PDA, mediu-se o tempo de suspensão de quatro membros. Resumidamente, este teste se baseia em um sistema de grade suspensa para medir de forma não invasiva a capacidade dos camundongos de exibir tensão sustentada nos membros para se opor à força gravitacional (Figura 27). Em comparação com os camundongos controle, o grupo PDX08 - NT exibem uma capacidade significativamente reduzida de se opor à força gravitacional ao final de 60 dias, apresentando pico médio do tempo de execução de 490 s com idade de seis semanas (ou seja, após duas semanas do início do experimento). A partir de então, seu desempenho diminuiu progressivamente para um tempo médio de execução de cerca de 250s. Apesar de não terem variação de peso, camundongos PDX12 - NT, também exibiram redução consistente no tempo de retenção em comparação com camundongos controle, atingindo um tempo médio de sustentação de 236 s na última semana de teste. Entretanto, o tratamento com Bj-PRO-10c alterou o tempo de médio de sustentação ao longo do tempo em nenhum dos grupos (Figura 28A).

Dado que o tempo de suspensão (TS) não leva em consideração a massa corporal do animal, correlacionamos o peso corporal e o TS de todos os camundongos na última semana para avaliar a influência potencial da massa corporal no impulso de

retenção (IR) (Equação 2). O teste de TS não é uma medida de geração de tensão física, pois envolve a manutenção da força mínima necessária para se opor à força gravitacional. Dessa forma, o impulso de retenção se apresenta como uma medida dessa força sustentada. Essa correlação é relevante, pois pode fornecer informações cruciais sobre a progressão da caquexia e sua relação com a capacidade de produzir tensão nos flexores dos membros. Os dados informam que tanto os grupos PDX08 quanto os PDX12 apresentaram baixos valores de impulso de retenção (valores se concentram na metade inferior do gráfico) ainda que apresentem grandes diferenças no peso corporal total (diferença de 6,0 g aproximadamente) (Figura 28B). Contudo, em concordância com os outros resultados comportamentais apresentados, o tratamento com o peptídeo não promoveu aumento significativo da força sustentada nos camundongos tratados ($P > 0,05$).



Figura 27: Teste de suspensão de quatro membros em tela invertida

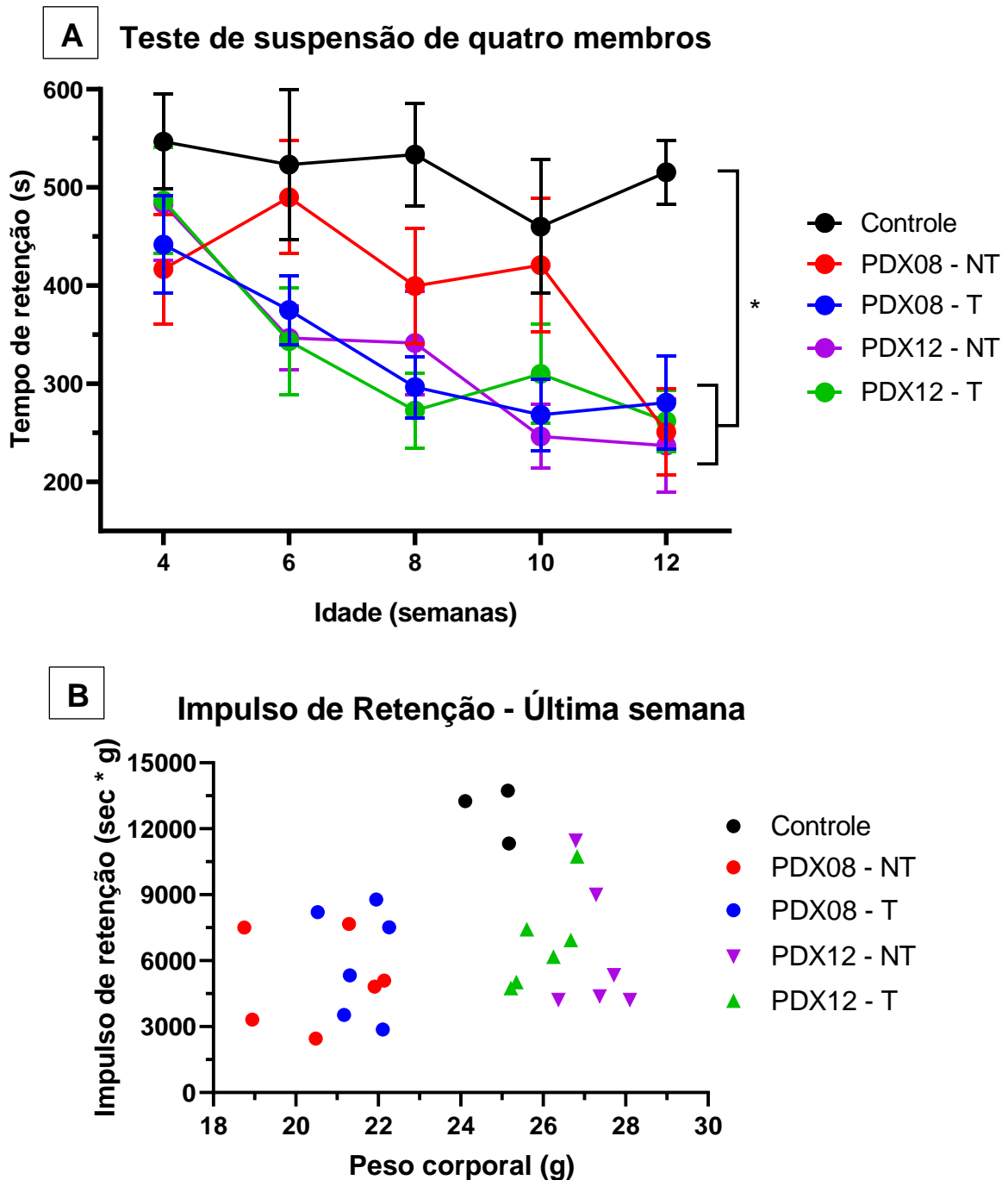


Figura 28: Avaliação do tempo de suspensão em relação ao desenvolvimento da caquexia. (A) Tempo médio de retenção e **(B)** força sustentada de impulso de retenção. Legenda: Controle – camundongos saudáveis livres de tumor; NT (não tratados) – camundongos que foram submetidos ao transplante de PDA e que não receberam tratamento com Bj-PRO-10c; T (tratados) – camundongos que foram submetidos ao transplante de PDA e que receberam tratamento com Bj-PRO-10c (1 μ g de Bj-PRO-10c por grama de peso corporal a cada 72h). As barras representam a média \pm S.E. Os dados dos grupos PDX foram comparados com o grupo controle utilizando one-way ANOVA seguida pelo teste Tukey para

comparações múltiplas. * representa diferenças estatisticamente significativas comparado ao grupo controle. Os valores são estatisticamente para * $P < 0,05$ ($n = 4-6$ por grupo).

4.8. Catabolismo do músculo esquelético e cardíaco

Dois subconjuntos principais de tecido muscular, esquelético e cardíaco, foram examinados em camundongos transplantados com PDA ao término do período experimental de 60 dias. A carga tumoral PDA resultou na atrofia do gastrocnêmio, músculo predominantemente glicolítico, que pesou 40% menos em camundongos do grupo PDX08 - NT em relação ao controle ($13,44 \pm 1,02$ vs $8,26 \pm 0,30$ mg / g de peso corporal inicial) ($P < 0,001$), e 25% menos em camundongos PDX08 - T ($13,44 \pm 1,02$ vs $10,22 \pm 0,29$ mg / g de peso corporal inicial) ($P < 0,001$) (Figura 29A). Ainda que em menor proporção, o grupo PDX12 - NT também apresentou redução de 15% na massa do gastrocnêmio em relação ao grupo controle ($13,44 \pm 1,02$ vs $11,47 \pm 0,28$ mg / g de peso corporal inicial) ($P < 0,05$), contudo, o tratamento não foi capaz de reverter essa perda no grupo PDX12 - T ($P > 0,05$) (Figura 29A). Da mesma forma, o músculo glicolítico tibial anterior também foi atrofiado no grupo PDX08 - NT, e atenuado pelo tratamento crônico com o Bj-PRO-10c no grupo PDX08 - T ($2,50 \pm 0,14$ vs $4,23 \pm 0,23$ mg / g de peso corporal inicial) ($P < 0,001$) (Figura 29B). Os músculos tibiais anteriores de ambos os grupos PDX12 não apresentaram redução significativa em relação ao controle ($P > 0,05$) (Figura 29B).

Quanto à massa cardíaca, apenas os animais PDX08 - NT apresentaram redução significativa na massa do coração em relação ao grupo de referência de $7,59 \pm 0,31$ para $5,57 \pm 0,24$ mg / g de peso corporal inicial ($P < 0,001$) (Figura 29C). No entanto, a administração crônica de Bj-PRO-10c nos animais PDX08 - T atenuou a atrofia cardíaca nesse modelo, aumentando a massa em torno de 29% em relação ao grupo não tratado ($7,21 \pm 0,08$ vs $5,57 \pm 0,24$ mg / g de peso corporal inicial) ($P < 0,001$). Ao avaliar os efeitos do xenotransplante de PDA no tecido cardíaco dos dois modelos NT, percebe-se que apenas o tumor derivado do paciente 08 induz atrofia cardíaca, uma vez que o grupo PDX12 - NT não apresentou redução tecidual significativa ($5,57 \pm 0,24$ vs $7,00 \pm 0,29$ mg / g de peso corporal inicial) ($P < 0,01$).

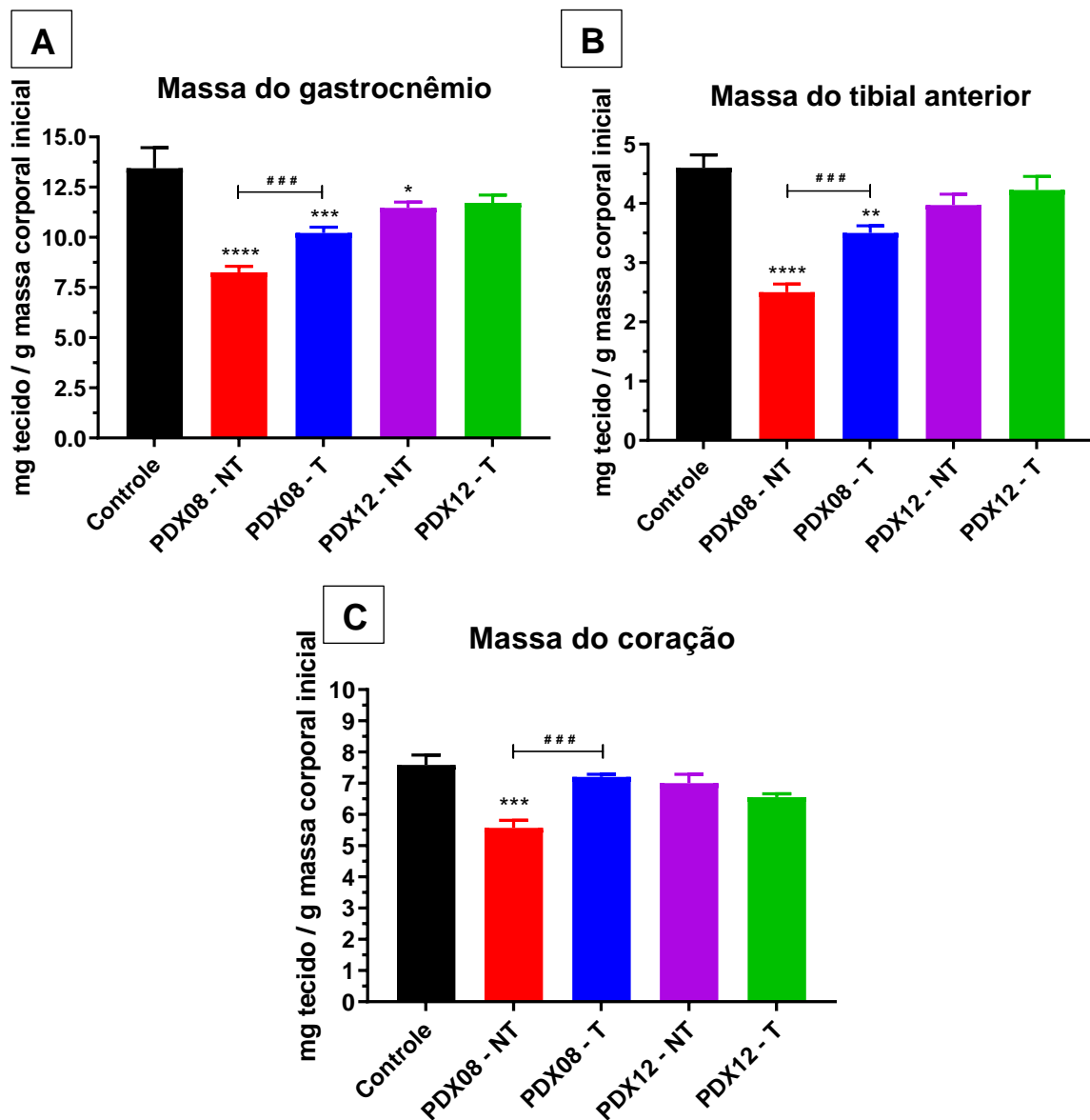


Figura 29: Os xenoenxertos PDA induzem atrofia do músculo esquelético e cardíaco. (A) Massa do músculo gastrocnêmio, (B) massa do músculo tibial anterior e (C) massa do coração. Legenda: Controle – camundongos saudáveis livres de tumor; NT (não tratados) – camundongos que foram submetidos ao transplante de PDA e que não receberam tratamento com Bj-PRO-10c; T (tratados) – camundongos que foram submetidos ao transplante de PDA e que receberam tratamento com Bj-PRO-10c (1 μ g de Bj-PRO-10c por grama de peso corporal a cada 72h). As barras representam a média \pm S.E. Os dados dos grupos PDX foram comparados com o grupo controle utilizando one-way ANOVA seguida pelo teste Tukey para comparações múltiplas. * representa diferenças estatisticamente significativas comparado ao grupo controle e # representa diferenças estatisticamente significativas entre o grupo PDX08 - NT e o grupo PDX08

- T. Os valores são estatisticamente para * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$. Os valores são estatisticamente diferentes para # $P < 0,05$; ## $P < 0,01$; ### $P < 0,001$ (n = 4-6 por grupo).

O catabolismo do gastrocnêmio (músculo misto com fibras de contração rápida e lenta) em animais controle vs PDX08 - NT coincidiu com um aumento relativo de 5,1 vezes na expressão gênica da ligase catabólica *Atrogin-1* (Figura 30A) e um aumento de 4,2 vezes em *MuRF1* (Figura 30B) ($P < 0,0001$), indicando que o catabolismo do músculo esquelético foi impulsionado pela indução dessas ubiquitina E3 ligases. Curiosamente, ainda que o grupo PDX12 - NT não tenha apresentado redução da massa do músculo gastrocnêmio, este apresentou aumento de aproximadamente 2,2 vezes na expressão gênica em *Atrogin-1* (Figura 30A) e um aumento de 4,4 vezes em *MuRF1* em relação ao controle (Figura 30B) ($P < 0,01$). Em consonância com esses achados, os marcadores de catabolismo (*Atrogin-1* e *MuRF1*) do músculo tibial anterior (músculo predominantemente glicolítico) também foram induzidos nos grupos PDX08 - NT e PDX12 - NT (Figura 30C-D). Adicionalmente, a administração crônica de Bj-PRO-10c nos animais PDX08 - T reduziu significativamente a expressão de *Atrogin-1* (redução de 25%) e *MuRF1* (redução de 26%) no músculo gastrocnêmio desses animais em relação ao grupo não tratado. No entanto, os níveis de expressão dos dois genes de atrofia muscular no músculo tibial anterior não se mostraram significativamente diferentes entre os modelos PDX12 - NT e PDX12 - T ($P > 0,05$) (Figura 30C-D). Da mesma forma, a expressão de *Atrogin-1* e *MuRF1* no músculo cardíaco de animais nos grupos PDX08 - NT e PDX12 - NT aumentou significativamente em relação ao grupo controle, porém, não apresentaram redução nos grupos tratados (Figura 30E-F) ($P > 0,05$).

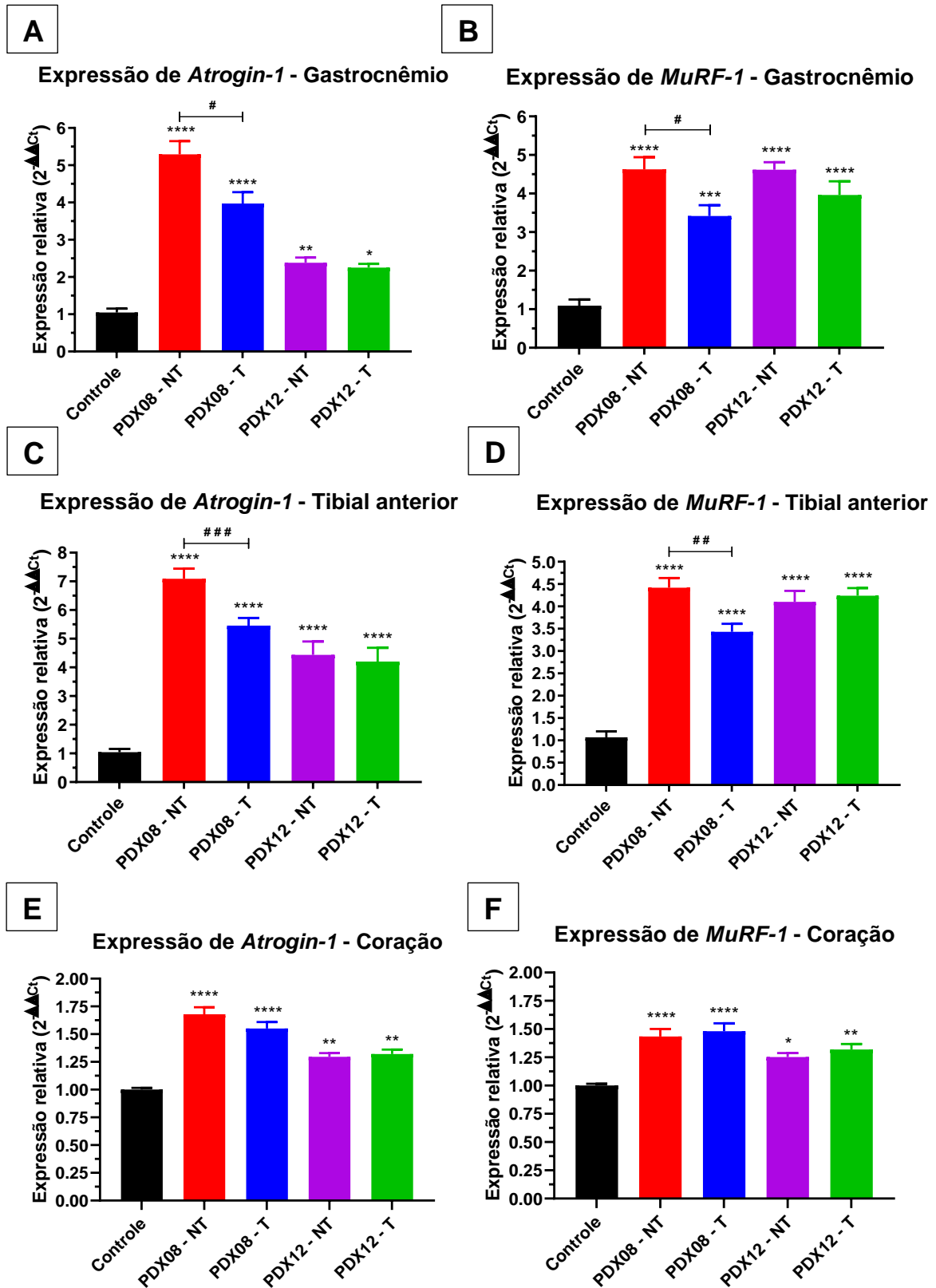


Figura 30: O desgaste muscular está diretamente relacionado com o aumento de genes reguladores da atrofia do músculo esquelético. Expressão gênica de (A) *Atrogin-1* no

gastrocnêmio, **(B)** *MuRF1* no gastrocnêmio, **(C)** *Atrogin-1* no tibial anterior, **(D)** *MuRF1* no tibial anterior, **(E)** *Atrogin-1* no coração e **(F)** *MuRF1* no coração. Legenda: Controle – camundongos saudáveis livres de tumor; NT (não tratados) – camundongos que foram submetidos ao transplante de PDA e que não receberam tratamento com Bj-PRO-10c; T (tratados) – camundongos que foram submetidos ao transplante de PDA e que receberam tratamento com Bj-PRO-10c (1µg de Bj-PRO-10c por grama de peso corporal a cada 72h). As barras representam a média ± S.E. Os dados dos grupos PDX foram comparados com o grupo controle utilizando one-way ANOVA seguida pelo teste Tukey para comparações múltiplas. * representa diferenças estatisticamente significativas comparado ao grupo controle e # representa diferenças estatisticamente significativas entre o grupo PDX08 - NT e o grupo PDX08 - T. Os valores são estatisticamente para * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$. Os valores são estatisticamente diferentes para # $P < 0,05$; # # $P < 0,01$; # # # $P < 0,001$ (n = 4-6 por grupo).

4.9. Tecido adiposo

Para investigar se a perda de tecido adiposo induzida por PDA seguiu as manifestações clínicas da caquexia associada ao câncer, avaliou-se a massa de tecido adiposo branco (TAB) e marrom (TAM). A carga tumoral PDA oriunda do paciente 08 resultou no desgaste acentuado do TAB, que pesou aproximadamente 93% menos em camundongos do grupo PDX08 - NT em relação ao controle ($18,99 \pm 0,93$ vs $1,26 \pm 0,24$ mg / g de peso corporal inicial) ($P < 0,0001$), e 70% menos em camundongos PDX08 - T ($18,99 \pm 0,93$ vs $5,78 \pm 0,79$ mg / g de peso corporal inicial) ($P < 0,001$). Ambos os grupos PDX12 não apresentaram empobrecimento do tecido adiposo branco visceral (Figura 31A).

Ainda que em menor proporção, o tecido adiposo marrom interescapular também foi desgastado no grupo PDX08 - NT, e atenuado pelo tratamento crônico com o Bj-PRO-10c no grupo PDX08 - T ($4,14 \pm 0,36$ vs $5,85 \pm 0,33$ mg / g de peso corporal inicial) ($P < 0,01$) (Figura 31B). Em contraste com o tecido adiposo branco, o TAM de ambos os grupos PDX12 apresentaram redução de aproximadamente 25% em relação ao controle, diminuição de $10,22 \pm 0,63$ para $7,65 \pm 0,34$ mg / g de peso corporal inicial no grupo PDX12 - NT ($P < 0,01$) e $10,22 \pm 0,63$ a $7,81 \pm 0,48$ mg no

grupo PDX12 - T ($P < 0,05$). Os dois grupos PDX12 não apresentaram diferenças significativas entre si (Figura 31B).

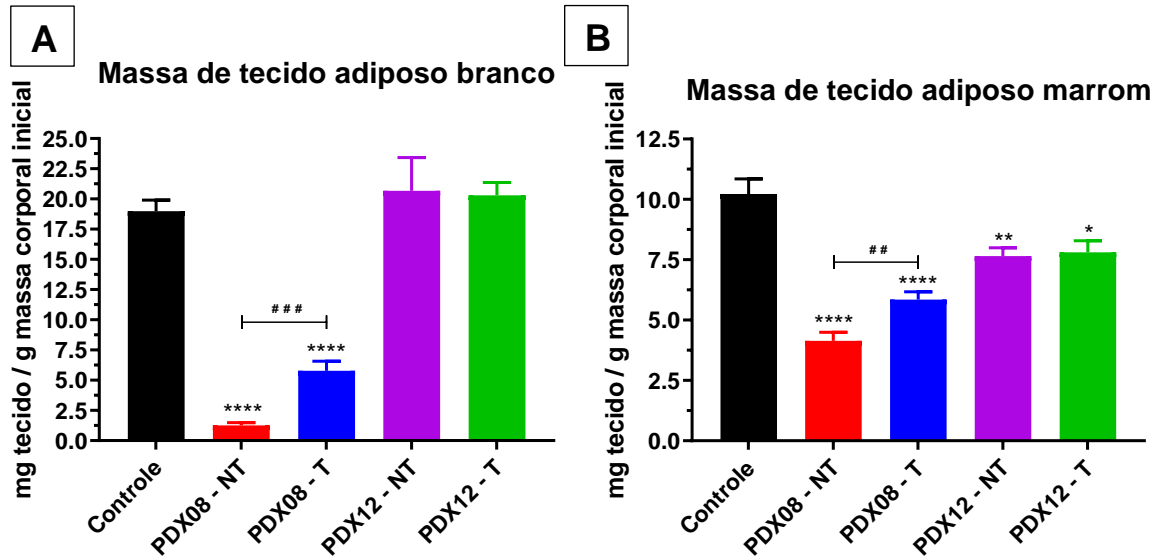


Figura 31: Tumores PDA induzem empobrecimento do tecido adiposo. (A) Massa do tecido adiposo branco visceral e **(B)** massa do tecido adiposo marrom interescapular. Legenda: Controle – camundongos saudáveis livres de tumor; NT (não tratados) – camundongos que foram submetidos ao transplante de PDA e que não receberam tratamento com Bj-PRO-10c; T (tratados) – camundongos que foram submetidos ao transplante de PDA e que receberam tratamento com Bj-PRO-10c (1 μ g de Bj-PRO-10c por grama de peso corporal a cada 72h). As barras representam a média \pm S.E. Os dados dos grupos PDX foram comparados com o grupo controle utilizando one-way ANOVA seguida pelo teste Tukey para comparações múltiplas. * representa diferenças estatisticamente significativas comparado ao grupo controle e # representa diferenças estatisticamente significativas entre o grupo PDX08 - NT e o grupo PDX08 - T. Os valores são estatisticamente para * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$. Os valores são estatisticamente diferentes para # $P < 0,05$; ## $P < 0,01$; ### $P < 0,001$ ($n = 4-6$ por grupo).

O empobrecimento de tecido adiposo nos animais transplantados com PDA foi acompanhado pelo aumento da expressão da proteína desacopladora mitocondrial UCP1. Demonstramos o aumento de 8,8 vezes da expressão do gene *Ucp1* no TAB (Figura 32A) e 7,5 vezes no TAM dos camundongos PDX08 - NT ($P < 0,05$) (Figura 32B). Da mesma forma, o grupo PDX12 - NT apresentou aumento do gene *Ucp1* de 3,4 vezes no TAB (Figura 32A) e 7,4 vezes no TAM em relação ao controle

($P < 0,0001$) (Figura 32B). Os níveis de *Ucp1* de animais PDX08 - T foram significativamente menores em TAB (redução de 10%) e TAM (redução de 17%) em relação ao grupo PDX08 - NT ($P < 0,01$). Os níveis de expressão de *Ucp1* entre os dois grupos PDX12 não apresentaram diferenças significativas entre si ($P > 0,05$) (Figura 32A-B).

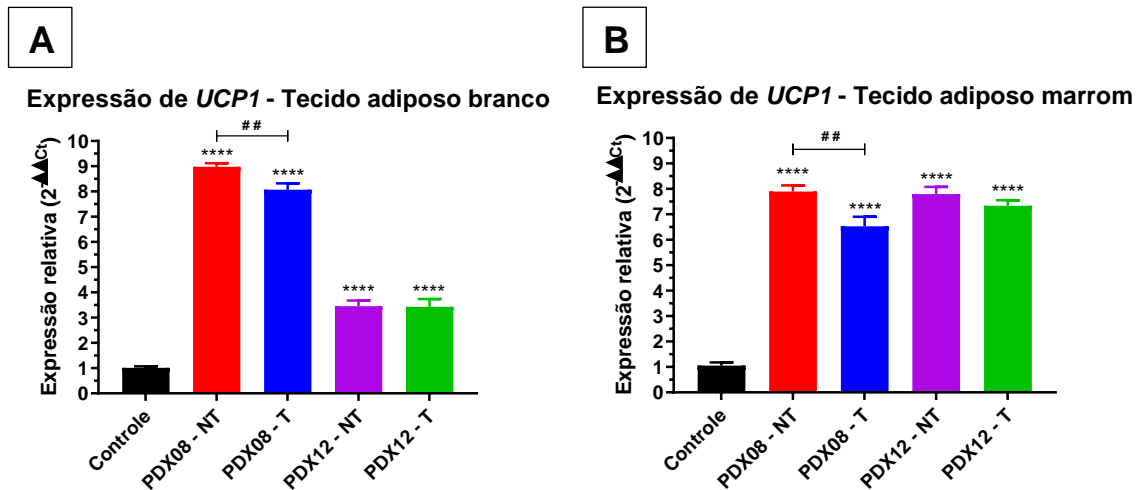


Figura 32: O empobrecimento do tecido adiposo está associado ao aumento da expressão de UCP1. (A) Expressão gênica de *Ucp1* no TAB e **(B)** expressão gênica de *Ucp1* no TAM. Legenda: Controle – camundongos saudáveis livres de tumor; NT (não tratados) – camundongos que foram submetidos ao transplante de PDA e que não receberam tratamento com Bj-PRO-10c; T (tratados) – camundongos que foram submetidos ao transplante de PDA e que receberam tratamento com Bj-PRO-10c (1 μ g de Bj-PRO-10c por grama de peso corporal a cada 72h). As barras representam a média \pm S.E. Os dados dos grupos PDX foram comparados com o grupo controle utilizando one-way ANOVA seguida pelo teste Tukey para comparações múltiplas. * representa diferenças estatisticamente significativas comparado ao grupo controle e # representa diferenças estatisticamente significativas entre o grupo PDX08 - NT e o grupo PDX08 - T. Os valores são estatisticamente para * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$. Os valores são estatisticamente diferentes para # $P < 0,05$; ## $P < 0,01$ (n = 4-6 por grupo).

4.10. Inflamação e resposta imune

Tendo em vista que alterações teciduais são frequentemente observadas em pacientes caquéticos, avaliamos as características macroscópicas do fígado e do

baço em necrópsia (Figura 33). Dado que o fígado está amplamente envolvido nas respostas inflamatórias sistêmicas a estímulos agudos e crônicos, contribuindo para a caquexia ao regular as principais vias metabólicas do corpo e produzir sinais pró-inflamatórios. Apenas os animais enxertados com PDA oriundo do paciente 08 demonstraram diminuição na massa hepática de $78,08 \pm 3,24$ para $64,23 \pm 3,53$ mg / g de peso corporal inicial no grupo PDX08 - NT ($P < 0,05$) e $78,08 \pm 3,24$ a $63,78 \pm 2,00$ mg no grupo PDX08 - T ($P < 0,05$). Os dois grupos não apresentaram diferenças entre si ($P > 0,05$) (Figura 34A).

Alterações teciduais no baço também são observadas com o crescimento do tumor, juntamente com a ativação da resposta imune. Curiosamente, os baços dos camundongos PDX12 demonstraram aumento consistente, com peso médio de $12,92 \pm 0,69$ mg / g de peso corporal inicial nos camundongos do grupo PDX12 - NT ($P < 0,0001$) e $14,27 \pm 0,69$ mg / g de peso corporal inicial para o grupo PDX12 - T ($P < 0,0001$), hiperplasias que correspondem a 131% e 161% em relação ao controle, respectivamente. Contudo, o tratamento crônico com peptídeo não se mostrou eficaz em reverter essa hiperplasia no grupo PDX12 - T ($P > 0,05$) (Figura 34B).

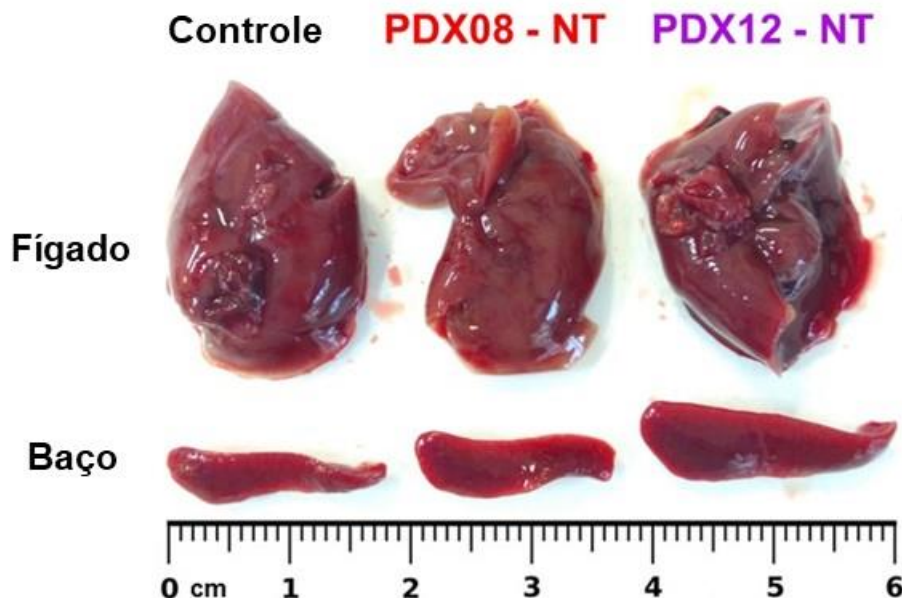


Figura 33: Aspecto macroscópico do fígado e do baço de camundongos nude controle, sem xenoenxerto; PDX08 - NT, animais transplantados com PDA do paciente 08 não tratados e PDX12 - NT, animais transplantados com PDA do paciente 12 não tratados.

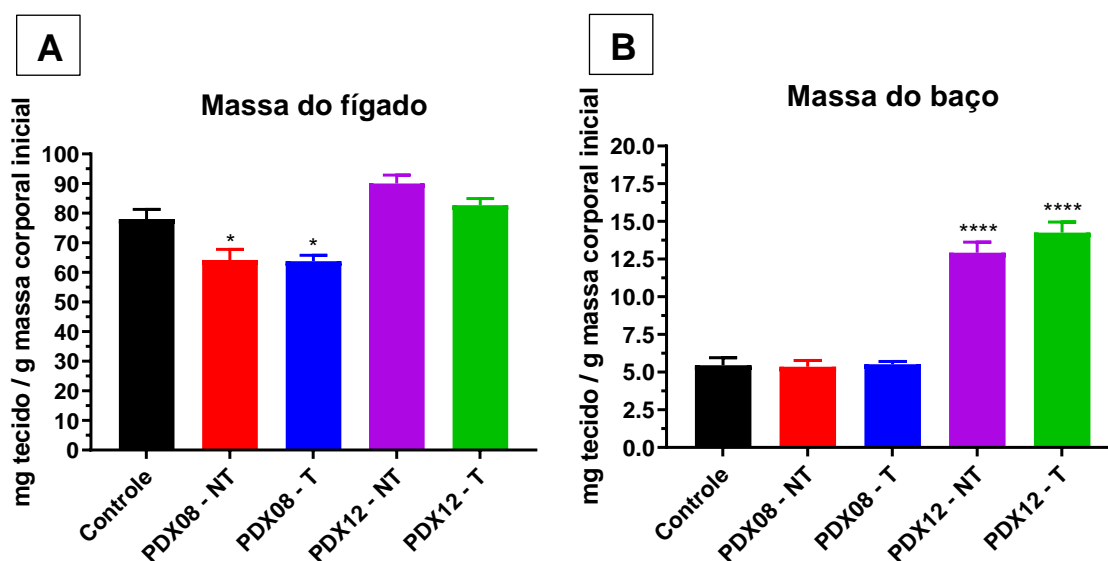


Figura 34: Esplenomegalia e alteração da massa hepática associada ao PDA. (A) Massa do fígado e **(B)** massa do baço. Legenda: Controle – camundongos saudáveis livres de tumor; NT (não tratados) – camundongos que foram submetidos ao transplante de PDA e que não receberam tratamento com Bj-PRO-10c; T (tratados) – camundongos que foram submetidos ao transplante de PDA e que receberam tratamento com Bj-PRO-10c (1µg de Bj-PRO-10c por grama de peso corporal a cada 72h). As barras representam a média ± S.E. Os dados dos grupos PDX foram comparados com o grupo controle utilizando one-way ANOVA seguida pelo teste Tukey para comparações múltiplas. * representa diferenças estatisticamente significativas comparado ao grupo controle. Os valores são estatisticamente diferentes para * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$ (n = 4-6 por grupo).

4.11. Características macroscópicas e microscópicas dos tumores

A fim de relacionar os efeitos observados com a carga tumoral, também avaliamos as características macroscópicas dos tumores dos camundongos PDX08 (Figura 35) e PDX12 (Figura 36). De acordo com os resultados, os camundongos PDX08 - NT apresentaram tumores maiores do que os camundongos PDX12 - NT no dia da necropsia ($2910 \pm 186,2$ mg vs $1769 \pm 173,0$ mg) ($P < 0,01$) (Figura 35A). Levando em consideração os efeitos do peptídeo, constatamos que as massas normalizadas dos tumores não foram significativamente diferentes entre os grupos

PDX08 - NT e PDX08 - T na necropsia ($2910 \pm 186,2$ mg vs $2685 \pm 164,2$ mg) ($P > 0,05$) (Figura 35A). Adicionalmente, em relação ao modelo PDX12, os camundongos PDX12 - NT apresentaram massa tumoral final inferior, porém, sem diferenças significativas em relação ao grupo tratado PDX12 - T ($1769 \pm 173,0$ mg vs $2375 \pm 222,2$ mg) ($P > 0,05$) (Figura 35A).

Considerando que em modelos animais a caquexia é por vezes intensificada de acordo com a evolução do tumor (De Lerma, 2015), avaliamos a variação do volume tumoral calculado através da Equação 1 (3.2.6). Ao avaliar o crescimento progressivo dos tumores, notamos que a diferença de tamanho do tumor entre os grupos PDX08 - NT e PDX12 - NT só se tornou significativa a partir do 44^o dia do período experimental (Figura 35B). Por fim, também avaliamos a progressão do volume tumoral ao longo do tempo em relação ao tratamento com Bj-PRO-10c e denotamos que o tratamento não mostrou alterar o tamanho do tumor dos grupos PDX08 e PDX12 em nenhum momento do período experimental (Figura 37C-D).

O grau de diferenciação histológica (H&E) e as características estromais foram examinados em ambos os grupos não tratados. O status histopatológico dos tumores oriundos dos camundongos PDX08 - NT foram classificados como carcinoma moderadamente diferenciado (Figura 38A), enquanto os tumores do grupo PDX12 - NT foram classificados como pouco diferenciados (Figura 38B). De modo geral, o exame de cortes histológicos obtidos a partir de amostras dos xenotumores indicou que estes retêm o perfil histológico característico de tumores humanos, com a formação de ductos e a presença de abundante estroma peritumoral.

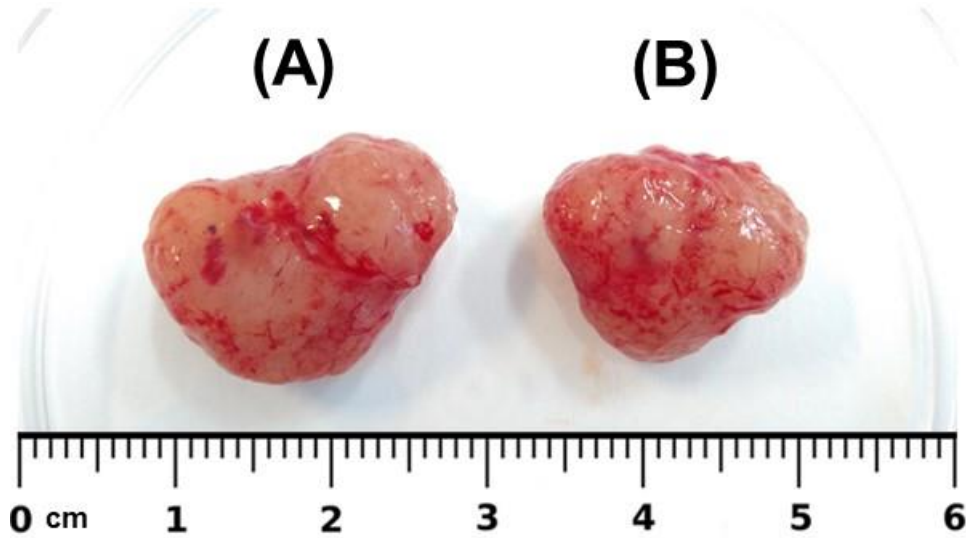


Figura 35: Aspecto macroscópico do tumor sólido do PDX08 em necrópsia. (A) Foto representativa de tumores de animais transplantados com PDA do paciente 08 não tratados (PDX08 - NT) e (B) animais transplantados com PDA do paciente 08 tratados (PDX08 - T).

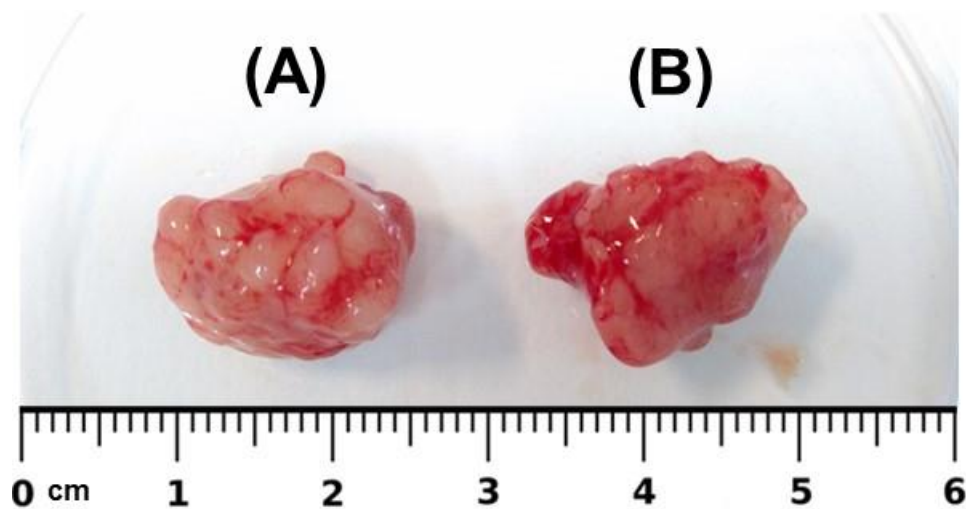


Figura 36: Aspecto macroscópico do tumor sólido do PDX12 em necrópsia. (A) Foto representativa de tumores de animais transplantados com PDA do paciente 12 não tratados (PDX12 - NT) e (B) animais transplantados com PDA do paciente 12 tratados (PDX12 - T).

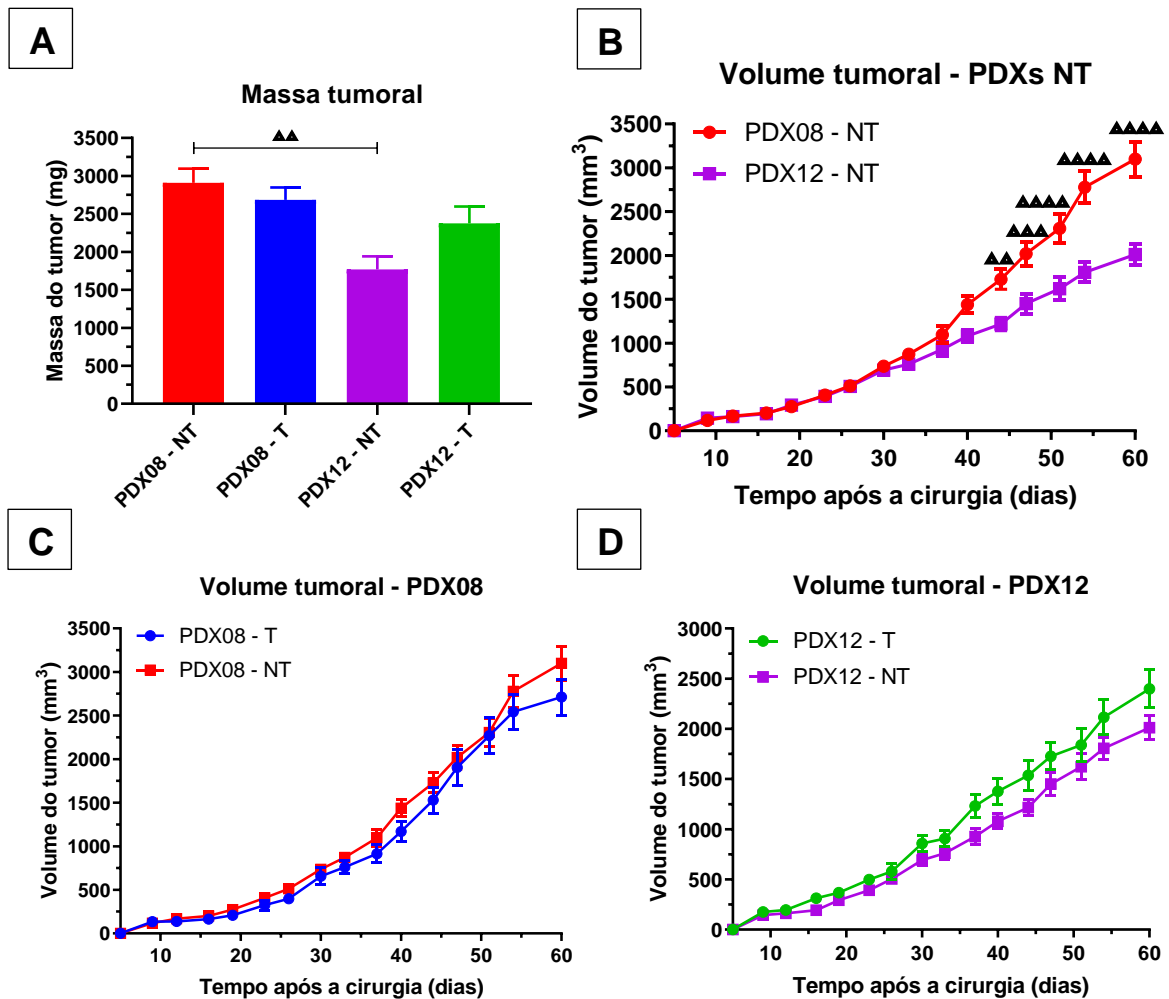


Figura 37: Carga tumoral em camundongos xenotransplantados com PDA. (A) Massa tumoral na necrópsia; **(B)** variação do volume tumoral dos grupos não tratados; **(C)** variação do volume tumoral dos grupos PDX08 e **(D)** variação do volume tumoral dos grupos PDX12. Legenda: Controle – camundongos saudáveis livres de tumor; NT (não tratados) – camundongos que foram submetidos ao transplante de PDA e que não receberam tratamento com Bj-PRO-10c; T (tratados) – camundongos que foram submetidos ao transplante de PDA e que receberam tratamento com Bj-PRO-10c (1µg de Bj-PRO-10c por grama de peso corporal a cada 72h). As barras representam a média ± S.E. Os dados dos grupos PDX foram comparados com o grupo controle utilizando one-way ANOVA seguida pelo teste Tukey para comparações múltiplas. Δ representa diferenças estatisticamente significativas entre os grupos PDX08 - NT e PDX12 - NT. Os valores são estatisticamente diferentes para $\Delta P < 0,05$; $\Delta\Delta P < 0,01$; $\Delta\Delta\Delta P < 0,001$; $\Delta\Delta\Delta\Delta P < 0,0001$ (n = 4-6 por grupo).

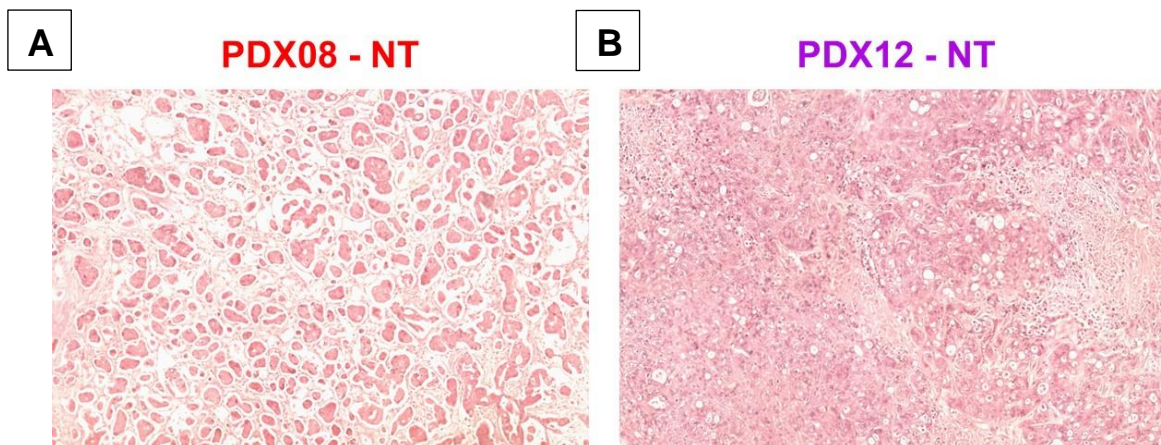


Figura 38: Características histopatológicas dos xenoenxertos de PDA. (A) Os tumores implantados nos camundongos PDX08 - NT apresentam grau de diferenciação classificada como moderadamente diferenciados e **(B)** os tumores implantados nos camundongos PDX12 - NT foram classificados como pouco diferenciados. Os cortes são corados com hematoxilina e eosina e fotografados com aumento de $\times 200$. A barra de escala é de $100\ \mu\text{m}$.

4.12. Avaliação toxicológica

Durante os testes toxicológicos de uma droga em desenvolvimento, vários órgãos podem fornecer informações cruciais sobre seus efeitos tóxicos. Os pulmões podem ser afetados por drogas absorvidas pelo sistema respiratório, e os testes podem detectar danos teciduais e alterações na função pulmonar. Especificamente, algumas drogas experimentais podem causar fibrose pulmonar, inflamação aguda e obstrução crônica do fluxo de ar. Essas condições podem resultar em enrijecimento e redução da capacidade de expansão pulmonar, afetando diretamente o tamanho dos pulmões. O sistema nervoso central também é frequentemente analisado para detectar toxicidade de drogas que afetam principalmente o cérebro, envolvendo testes de função cognitiva, comportamental e morfológica. Algumas substâncias podem estimular o crescimento neuronal, promover a neurogênese e afetar outros processos cerebrais que levam a alterações no tamanho e estrutura cerebral. Os rins, responsáveis pela excreção de substâncias tóxicas, são examinados quanto a danos e mudanças na função renal. A nefrotoxicidade, obstrução renal, cicatrizes geradas por lesões e redução do fluxo sanguíneo renal afetam diretamente o tamanho dos rins, podendo levar a morte celular e atrofia renal. Esses órgãos, juntamente com outros

tecidos e sistemas relevantes, são selecionados com base no perfil de toxicidade da droga, fornecendo informações abrangentes sobre os efeitos tóxicos potenciais (Patel et al., 2020; Bugrim et al., 2004). A fim de caracterizar o perfil toxicológico da administração crônica de Bj-PRO-10c, órgãos como pulmão, cérebro e rim foram excisados e analisados. Macroscopicamente, os órgãos coletados apresentaram aspecto, coloração, tamanho, e consistência normais. Não ocorreram alterações significativas no peso dos órgãos internos em nenhum dos grupos tratados com o peptídeo (Figura 39A-C). Quanto às alterações histopatológicas induzidas pelo tumor na ausência de tratamento, apenas o modelo PDX08 - NT apresentou redução significativa da massa dos rins em relação ao controle de $19,34 \pm 0,68$ para $15,00 \pm 0,78$ mg / g de peso corporal inicial ($P < 0,01$) (Figura 39C).

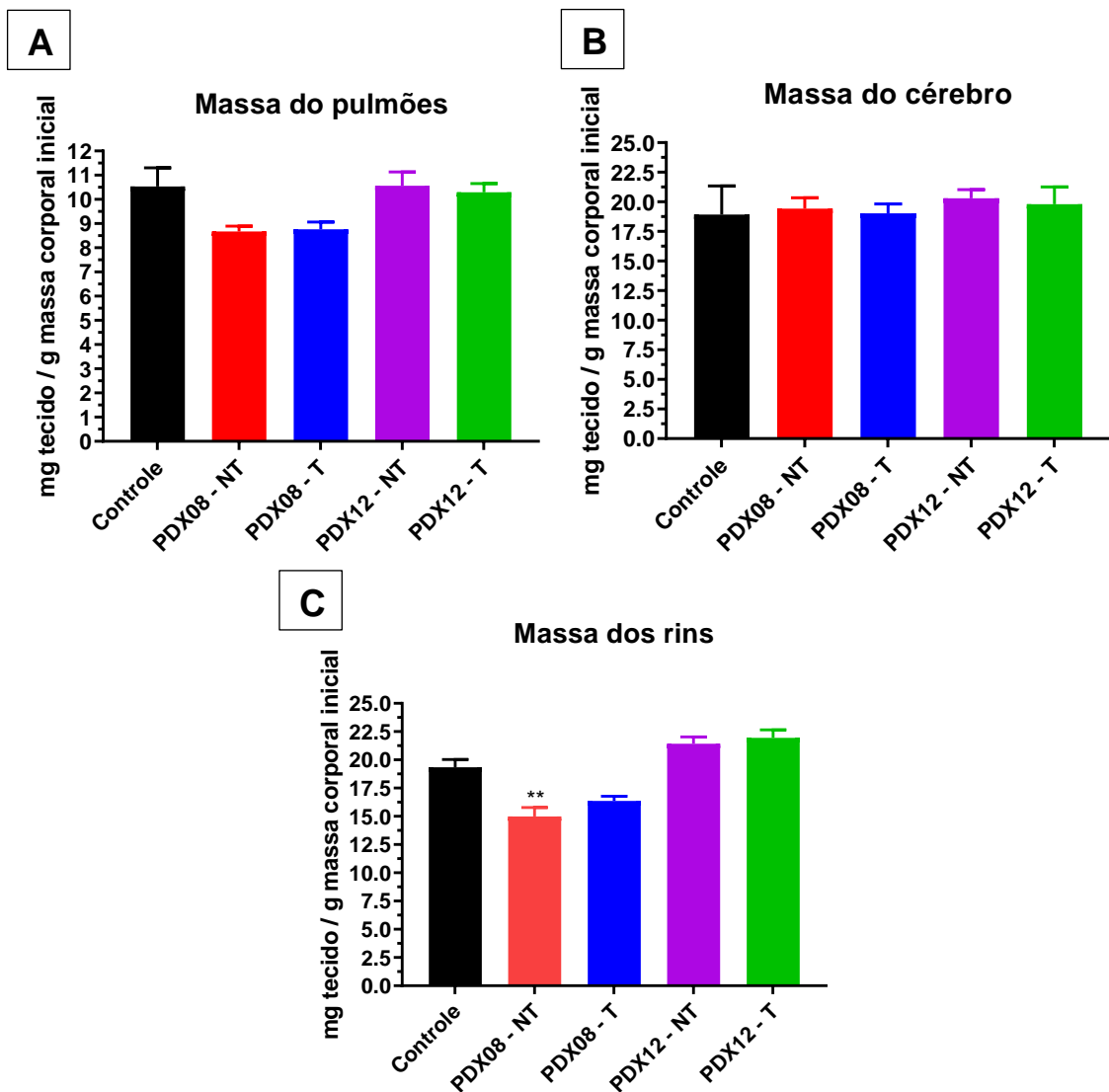


Figura 39: Avaliação toxicológica da administração crônica de Bj-PRO-10c. (A) massa do pulmão, **(B)** massa do cérebro e **(C)** massa do rim. As barras representam a média \pm S.E. Legenda: Controle – camundongos saudáveis livres de tumor; NT (não tratados) – camundongos que foram submetidos ao transplante de PDA e que não receberam tratamento com Bj-PRO-10c; T (tratados) – camundongos que foram submetidos ao transplante de PDA e que receberam tratamento com Bj-PRO-10c (1 μ g de Bj-PRO-10c por grama de peso corporal a cada 72h). Os dados dos grupos PDX foram comparados com o grupo controle utilizando one-way ANOVA seguida pelo teste Tukey para comparações múltiplas. Os valores são estatisticamente diferentes para * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ (n = 4-6 por grupo).

5. DISCUSSÃO

5.1. Parte 1: Modelos animais de caquexia induzida por xenoenxerto de câncer pancreático derivado de paciente

O câncer de pâncreas é uma das doenças malignas mais letais, com sobrevida inferior a 5% em 5 anos (Lin et al., 2015). Um dos principais contribuintes para a baixa taxa de sobrevivência é a presença de caquexia, observada em mais de 80% dos pacientes com câncer pancreático (Ronga et al., 2014). Entre as complicações mais graves do câncer, a caquexia é uma síndrome multissistêmica que envolve distúrbios metabólicos; perda da imunocompetência; perda de habilidades físicas e motoras; e alterações comportamentais, incluindo anorexia, fadiga e ansiedade. Embora a compreensão da base molecular da caquexia tenha avançado significativamente na última década, a tradução desses avanços em melhores resultados no cuidado dos pacientes ainda é um desafio. Como os estudos mecanísticos da caquexia do câncer são difíceis de completar em pacientes humanos, o conhecimento atual dos mecanismos que levam ao desgaste induzido pelo câncer deriva principalmente de modelos animais. No entanto, esforços extensos têm sido feitos para estabelecer e caracterizar xenoenxertos feitos com linhagens de células. Infelizmente, esses modelos não representam fielmente a condição humana, e tendem a perder as características heterogêneas dos tumores originais. Portanto, o desenvolvimento de modelos de pesquisa que representem melhor a substancial heterogeneidade e complexidade biológica dos tumores humanos será importante para recapitular e compreender com precisão esta doença, bem como promover o desenvolvimento bem-sucedido de novas abordagens terapêuticas. Com esse cenário em mente, o objetivo primário deste trabalho foi gerar e estabelecer as características clínicas principais de dois modelos experimentais de caquexia do câncer que incorporam o mesmo tipo de tumor humano (PDA), contudo, oriundos de pacientes distintos.

Os xenoenxertos de tumor derivados do paciente são úteis por sua capacidade de testar casos únicos de tumor, bem como investigar as correlações entre o fenótipo do paciente e os resultados de caquexia murina, mas requerem imunossupressão e

provavelmente serão incapazes de recapitular com precisão as complexas interações entre as células neoplásicas e as células imunes. Porém, ainda que tenha sido utilizado um protocolo de xenoenxerto em camundongos com a imunidade comprometida, devido a deficiência em células T, estes ainda retêm a capacidade de desenvolver uma resposta imune, como por exemplo, através de células *natural killer* (NK) que constituem a primeira linha de defesa contra o desenvolvimento de câncer e metástase (Kim et al., 2019). Além disso, os protocolos experimentais podem desencadear diferentes respostas de estresse nas células cancerosas que facilitam o reconhecimento das células NK. Por fim, o uso de camundongos imunodeficientes é um aspecto chave nesse contexto, pois somente com o uso de tais modelos é possível recapitular diversas interações tumor / microambiente e que frequentemente desenvolvem metástases à distância (Kim et al., 2009), fornecendo um meio coerente e reprodutível para análises experimentais.

Como diferentes fontes de xenotransplante de PDA podem produzir vários graus de caquexia, foi importante que inicialmente caracterizássemos os dois modelos de caquexia. Curiosamente, cada xenoenxerto induziu um perfil único de aspectos clínicos associados à caquexia humana. Em linhas gerais, descobrimos que o transplante de PDA obtido a partir do paciente 12 induziu caquexia “leve”, sem alteração significativa na massa corporal livre de tumor, pequena diminuição da massa muscular do gastrocnêmio e do tecido adiposo marrom (normalizada pela massa corporal inicial), redução da atividade locomotora espontânea e nenhuma mudança na ingestão de alimentos. Por outro lado, o transplante proveniente do paciente 08 induziu caquexia grave, com grande perda de massa corporal livre de tumor, músculo, coração e massa gorda, além de redução do desempenho locomotor. Essas descobertas também não foram devidas à anorexia, porque não houve diferenças significativas na maioria desses parâmetros entre os grupos PDX08 - NT e os camundongos controles alimentados *ad libitum*. Notavelmente, esses achados estão em consonância com os resultados clínicos observados nos pacientes que doaram as amostras tumorais. O paciente 08 (PDX08) era do sexo feminino, diabética, apresentava acentuada perda de peso e faleceu com presença de carcinomatose avançada. Já o paciente 12 (PDX12) era do sexo masculino, sem histórico de perda de peso e veio a óbito pouco tempo após o início da quimioterapia. Como comentado anteriormente, os modelos PDX mimetizam com elevada precisão os tumores

humanos e são capazes de replicar com precisão o crescimento e progressão tumoral, incluindo potencial metastático (Tentler et al., 2012).

De acordo com o consenso internacional, a caquexia é caracterizada pela perda contínua e involuntária de peso e massa muscular, com ou sem perda de massa gorda (Fearon et al., 2011). Os primeiros sintomas percebidos pelo paciente incluem perda de peso e de apetite (Brown, 2002). Durante o período experimental, constatou-se que alguns camundongos perderam peso corporal livre de tumor (PDX08 - NT) enquanto outros apresentaram variação positiva (PDX12 - NT) do peso final, sugerindo que a perda de peso não se deve aos animais utilizados e sim ao PDX. Além disso, demonstramos que todos os grupos de camundongos portadores de PDA apresentaram comprimentos de tíbia semelhantes ao grupo controle, sugerindo que os pesos corporais reduzidos dos camundongos PDX08 - NT não se devem a uma falha no crescimento. Por fim, vale salientar que os camundongos foram levados até o ponto final humanitário para limitar a dor e o sofrimento. As abordagens para a avaliação de *endpoint* humanitário foram baseadas em parâmetros fisiológicos, como peso corporal, aparência geral (incluindo pele, orifícios e postura), movimentação, consumo de alimentos e tamanho do tumor (Mei et al., 2019). Caso o experimento fosse levado adiante, os resultados poderiam ser mais expressivos, e até mesmo novos resultados seriam observados no grupo PDX12 - NT, como será discutido posteriormente.

Outro aspecto que pode explicar a variação positiva de peso do grupo PDX12 - NT envolve a agressividade intrínseca do tumor. O desenvolvimento de um tumor é um processo complexo, começando com a expansão clonal de células atípicas que deixam de ser reconhecidas pelo sistema de defesa do organismo (Hanahan et al., 2000). Posteriormente, o gasto energético leva ao desperdício, pois os tecidos tumorais metabolizam aproximadamente dez vezes mais glicose à ácido lático do que tecido normais, mesmo em condições aeróbias, um fenômeno conhecido como efeito de Warburg (Koppenol et al., 2011). À vista disso, a perda de peso no câncer é frequentemente atribuída a uma combinação de diminuição da ingestão de alimentos e hipermetabolismo. Contudo, o *feedback* metabólico no câncer é heterogêneo. Alguns pacientes mostram um aumento no gasto energético de repouso, enquanto outros mostram nenhuma mudança ou são hipometabólicos. Tem sido demonstrado que, em pacientes caquéticos com câncer de pulmão, ainda que o gasto em repouso

se encontre aumentado, o gasto energético total permanece reduzido (Gibney et al., 1997). Tal heterogeneidade pode sugerir justificativas para os fenômenos observados no período experimental. Embora o grupo PDX12 tenha exposto aumento do peso corporal livre de tumor, a ingestão de alimentos foi estável durante todo o período experimental. Esses resultados sugerem que provavelmente o xenotumor esteja induzindo um comportamento hipometabólico, por reduzir o gasto energético de total desses animais, além de induzir um comportamento menos ativo por modular respostas neuroendócrinas.

O papel da anorexia no processo fisiopatológico da caquexia é controverso. No entanto, há uma tendência a considerar que, embora a anorexia seja um componente importante do processo, não deve ser tomada como regra. Diferentes estudos mostram que não há diferenças significantes na ingestão energética quando se avaliam pacientes caquéticos e se comparam estes com pacientes de peso estável (Bosaeus et al., 2001). No presente estudo, a ingestão alimentar esteve de acordo com essas observações. Embora a ingestão alimentar apresentou variação, em nenhum grupo foi significativamente diferente de controles saudáveis, demonstrando que os nossos modelos PDA não induzem anorexia em camundongos.

Também foram avaliados os potenciais tumorigênicos dos xenotumores derivados de paciente pela inoculação subcutânea de pequenos fragmentos de tumor (1 a 3 mm³) em camundongos *nude*. Os xenotransplantes induziram a formação de tumores em todos os animais, com tamanho médio crescente. Os xenotumores derivados do paciente 08 (PDX08 - NT) apresentaram massa média final de 2910 mg, enquanto os xenotumores provenientes do paciente 12 (PDX12 - NT) apresentaram 1769 mg no mesmo período. Contudo, o grau de caquexia não está associado ao tamanho da massa tumoral.

Até a década de 1980, a caquexia era geralmente considerada como resultado da deficiência de energia causada pela combinação do aumento de consumo energético do tumor em crescimento e diminuição da ingestão de alimentos devido à fatores por esse secretados (Bruera et al., 2000). A inadequação dessa hipótese se torna evidente quando se comparam as necessidades energéticas de um tumor àqueles de um feto em desenvolvimento, que, embora superiores, não induzem no organismo materno qualquer resposta semelhante à caquexia (Melo et al., 2011).

Adicionalmente, tentativas de reverter a caquexia do câncer por meio da administração de suplementação de forma enteral ou parenteral não mostraram melhora significativa na maioria dos desfechos clínicos (Klein et al., 1994; Apelgren et al., 1984). Em nossos resultados, ainda que os xenotumores PDX08 - NT sejam maiores que os do grupo PDX12 - NT, mostramos que os tumores só se tornam estatisticamente diferentes a partir do 44º dia do experimento, contudo, a variação do peso corporal entre os dois grupos é distinta desde o início, se tornando estatisticamente diferente a partir do 19º dia, muito antes dos tumores tomarem proporções dessemelhantes.

A graduação histopatológica do PDA é um importante fator prognóstico para a sobrevida ao câncer (Hartwig et al., 2011) e é realizada de acordo com os critérios definidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS), sendo o grau de diferenciação do epitélio ductal o principal parâmetro utilizado para a classificação histológica do tumor. Os tumores pouco diferenciados são compostos por menos de 50% de ductos, enquanto em tumores moderadamente diferenciados essa extensão é de 50 a 95% e, em amostras bem diferenciadas, acima a 95% (Torres et al., 2013). De maneira geral, o PDA consiste em glândulas tubulares atípicas que se assemelham a ductos pancreáticos de tamanho médio ou menor (Haeberle et al., 2019). No entanto, os padrões de crescimento são frequentemente heterogêneos entre e dentro dos tumores. Embora a maioria compartilhe uma patogênese molecular semelhante, o comportamento biológico e prognóstico pode divergir entre os tumores e pacientes, estando diretamente relacionado com a heterogeneidade caquética. Ao analisar o perfil de expressão de PDA primários e linhagens de células PDA humanas e de camundongos, Collisson et al. (2011) identificou que os subtipos moleculares de PDA divergiam em resultado clínico e resposta a medicamentos. Em consonância com essas afirmações, nossos dados histopatológicos demonstram claramente a diversidade fenotípica (classificados como moderadamente e pouco diferenciados), além de denotar que os xenotransplantes mantêm as características histológicas e microambientais representativas do PDA humano. Tendo esses resultados em vista, o próximo passo deve ser uma avaliação abrangente de seus perfis de expressão gênica, bem como a análise molecular quanto ao status mutacional desses xenotumores.

Em alinhamento com outros modelos de caquexia, demonstramos que o catabolismo muscular é um aspecto chave da caquexia induzida por PDA. Dado que músculos com alta preponderância de fibras de contração rápida são particularmente suscetíveis à perda em estados inflamatórios (Braun et al., 2011), selecionamos o gastrocnêmio e tibial anterior para análise do músculo esquelético. De fato, o crescimento dos tumores PDA induziu atrofia do tecido muscular, com maior proporção no grupo PDX08. Além disso, o presente estudo confirma que os animais PDX12 - NT tiveram perda muscular mesmo sem perder peso. Isso aponta para o aumento da atrofia em animais PDA e corrobora com os achados de fraqueza muscular e níveis mais baixos de atividade física.

O aumento da quebra de proteínas resulta em perda muscular relacionada à caquexia. A perda da homeostase entre a degradação e a síntese de proteínas musculares é iniciada por um conjunto de ligases de ubiquitina específicas do músculo, incluindo MuRF1 e Atrogin-1, que têm como alvo proteínas para degradação pelo proteossoma. A ativação desses constituintes acelera a ubiquitinação do substrato, aumenta a degradação proteica em proteossomos e potencializa a atrofia e perda do músculo esquelético, levando à caquexia do câncer (de Palma et al., 2008). Nosso estudo demonstra que o catabolismo do músculo esquelético de animais transplantados com PDA corresponde a altos níveis de expressão das ligases de ubiquitina MuRF1 e Atrogin-1. Descobrimos ainda que a indução desses genes também está presente nos animais que não apresentaram atrofia muscular exacerbada (PDX12) no período experimental. Esse achado denota que importantes alterações metabólicas podem preceder os sintomas clínicos que são mais evidentes na fase refratária da caquexia. No entanto, reconhecer essas alterações bioquímicas presentes no início da síndrome pode ser a chave para a implementação antecipada de intervenções que reduzem ou retardem o desenvolvimento da doença.

Além do músculo esquelético, o músculo cardíaco costuma ser profundamente catabólico e funcionalmente comprometido pela caquexia do câncer. A disfunção cardíaca está independentemente associada com morbidade e mortalidade substanciais na caquexia, e seus fundamentos mecânicos são, portanto, um importante tópico de investigação. O catabolismo do músculo cardíaco na caquexia foi previamente relacionado à indução de autofagia e variavelmente à expressão de ubiquitina ligases associadas à atrofia (Cospers et al., 2011; Hinch et al., 2013). Nossos

dados estabelecem que o modelo PDX08 - NT é semelhante a outros modelos de caquexia, produzindo catabolismo do músculo cardíaco. Ao estabelecer e caracterizar um modelo murino de caquexia induzida por células tumorais de PDA, Michaelis et al. (2017) indicaram o catabolismo do músculo esquelético pela ativação de ligases E3 e catabolismo do músculo cardíaco via autofagia, mas que ambas as vias são ativas em ambos os subconjuntos de tecido.

A perda de gordura do tecido adiposo na caquexia do câncer é parcialmente o resultado do aumento da lipólise (Rydén et al., 2008). Taxas elevadas de lipólise na caquexia contribuiriam para a perda de gordura corporal total apenas se a utilização de lipídios também aumentasse. Estudos clínicos relataram taxas elevadas de oxidação de ácidos graxos (Dahlman et al., 2010; Zuijdgeest-van et al., 2000) e ativação da termogênese (isto é, aumento do desacoplamento mitocondrial da fosforilação oxidativa e elevada β -oxidação de ácido graxo) no tecido adiposo marrom (Tsoli et al., 2012; Arruda et al., 2010), contribuindo para a utilização elevada de lipídios, pelo menos nas fases avançadas da caquexia. Além disso, estudos relacionaram o estímulo da lipólise no tecido adiposo branco com o aumento da oxidação de ácidos graxos e desacoplamento em depósitos de gordura branca (Jaworski et al., 2009). Este fenótipo semelhante ao tecido adiposo marrom também pode contribuir para a utilização elevada de lipídios na caquexia e, portanto, depleção do tecido adiposo. Consistente com esses estudos, nossos modelos demonstram de forma significativa que a perda de tecido adiposo é um evento definidor na progressão da caquexia PDA.

Entre os diferentes órgãos associados a caquexia, os mecanismos por trás da comunicação entre o tecido adiposo e o tumor estão sob extensa investigação. Em humanos, o tecido adiposo branco (TAB) possui funções endócrinas e parácrinas, além de armazenar energia na forma de triglicerídeos (Daas et al., 2018). Em comparação, o tecido adiposo marrom (TAM) é particularmente rico em mitocôndrias e gotículas citoplasmáticas dispersas (Sun et al., 2020). A assinatura mais distinta no TAM é a expressão de níveis elevados de UCP1 mitocondrial, que é a chave para a oxidação lipídica e termogênese. Contudo, o TAM não é o único tecido termogênico em camundongos e humanos. Outro tipo de adipócito, o adipócito "bege", originado pelo escurecimento de uma população precursora de adipócitos maduros brancos, mas também expressa UCP1, contribui para o aumento do gasto energético e da

mobilização de lipídios (Kaisanlahti et al., 2019). Clinicamente, a ativação do TAM e o escurecimento do TAB são considerados métodos promissores no combate às síndromes metabólicas. No entanto, tem-se demonstrado que o escurecimento do TAB é deletério no contexto do câncer, contribuindo para a dissipação de energia e progressão para a caquexia (Petruzzelli et al., 2014). O "escurecimento" do TAB ou aumento da atividade do TAM podem se dar por meio do aumento da expressão de genes como *Ucp1* (Kir et al., 2014). UCP1 atua como um desacoplador do transporte de elétrons mitocondrial, que modula o metabolismo dos adipócitos para aumentar a termogênese sem a síntese concomitante de ATP, aumentando o gasto energético e a mobilização lipídica (Petruzzelli et al., 2014). Em consonância com os modelos atuais, nós demonstramos que a adiposidade reduzida está diretamente relacionada a elevados níveis de expressão de *Ucp1* em camundongos transplantados com PDA. Tomados em conjunto, nossos dados sugerem que o aumento da expressão de *Ucp1* no tecido adiposo de pacientes com caquexia induzida por PDA indica que a atrofia dos adipócitos pode estar associada ao aumento da atividade termogênica e diminuição dos lipídeos séricos. Esses dados sugerem que a modulação do metabolismo do tecido adiposo representa uma abordagem promissora para melhorar a gravidade da caquexia em pacientes com câncer.

Além da perda de massa muscular e tecido adiposo, nossos dados estabelecem que o PDA é uma doença altamente inflamatória que abrange vários órgãos. Em pacientes com doença metastática, a organomegalia pode exercer efeito catabólico quantitativamente importante em virtude de seu tamanho e consumo de energia. Apoiado por estimativas baseadas em um modelo computacional do metabolismo humano, sugere-se que uma influência catabólica considerável subjacente à caquexia do câncer colorretal é exercida pelas demandas energéticas do fígado e metástases e, em menor grau, do baço (Liefers et al., 2009). Curiosamente, observamos redução da massa hepática do grupo PDX08 - NT. Uma vez que a hepatomegalia contribui para o aumento do gasto energético em repouso; a redução da massa hepática, e conseqüentemente atenuação de GER, parece não explicar, por si só, a perda de peso acentuada nesses camundongos. Já para o grupo PDX12 - NT, suspeitamos que o aumento da massa esplênica se deve ao estímulo da resposta imune devido à inflamação, onde o baço praticamente dobrou de tamanho em relação ao controle. A arquitetura única do baço permite interações entre os

sistemas circulatório, imunológico e reticuloendotelial (Fang et al., 2014). Logo, a esplenomegalia é considerada uma manifestação de hiperfunção, incluindo hiperplasia imune, remoção de glóbulos vermelhos defeituosos e hematopoiese extramedular, e pode refletir como hipertensão portal secundária, insuficiência hepática ou obstrução venosa e infiltração em doenças como câncer metastático (Zhang et al., 2020; Zimmers et al., 2016). Em concordância com nossos achados, o aumento do baço é uma característica tanto de PDA quanto de caquexia (Bonetto et al., 2016; Michaelis et al., 2017; Talbert et al., 2014). Além disso, o laudo anatomopatológico (Apêndice D) aponta que o paciente doador 12 apresentava o baço duas vezes maior se comparado ao baço de um humano saudável, confirmando mais uma vez que os modelos animais são capazes de reproduzir os efeitos caquéticos encontrados em humanos. Por fim, avaliamos as alterações anatômicas de tecidos que são típicos locais de metástases no câncer de pâncreas, incluindo pulmão, cérebro e rim (Saif et al., 2010). Contudo, não observamos grandes diferenças de tamanho nesses órgãos.

Outra limitação dos modelos pré-clínicos de caquexia atuais, que restringe o desenvolvimento de tratamentos eficazes, está relacionada à falta de avaliação da função muscular. Pacientes com caquexia do câncer exibem deficiências funcionais, incluindo redução da mobilidade e dos níveis de atividade física. No presente estudo, descrevemos uma variedade de testes realizados em modelos murinos de caquexia do câncer que avaliam de forma abrangente as mesmas deficiências funcionais experimentadas por pacientes caquéticos, incluindo o desempenho locomotor progressivo e o caráter exploratório. Como nas três primeiras semanas os grupos não apresentaram diferença estatística na distância percorrida, é fundamentada a ausência de comprometimento motor dos animais, e os resultados dos testes comportamentais realizados podem ser considerados válidos. Já na última semana, verificamos que camundongos PDX08 - NT gravemente caquéticos exibiram redução de 48% na distância total percorrida e aumento de 123% na duração do tempo imóvel em comparação com os controles. Curiosamente, ainda que o grupo PDX12 - NT não tenha apresentado perda de peso e elevada atrofia muscular, a redução na atividade locomotora e o aumento do tempo imóvel foram significativamente diferentes dos controles na semana 7 (35% e 82%, respectivamente).

Junto com a massa muscular, a fadiga é um forte preditor de sobrevivência em pacientes com câncer. A fadiga é geralmente conceituada em termos de 'percepção' ou 'declínio no desempenho'. A fadiga é desencadeada por (I) fatores que afetam o desempenho (por exemplo, contração de músculos e ativação voluntária) e por (II) fatores que modulam as percepções de fadiga (por exemplo, fatores afetivos como humor e excitação, mas também fatores homeostáticos como estado de energia e hidratação) (Kluger et al., 2013). Fadiga, fraqueza e intolerância ao exercício foram relatadas em mais de 70% dos pacientes com câncer (Curt et al., 2000). De fato, a perda de peso associada ao desgaste muscular nos camundongos PDX08 - NT, refletem no aumento da fadiga e conseqüentemente, redução da mobilidade. O presente estudo fornece evidências para apoiar o papel direto do desgaste muscular no desenvolvimento da fadiga. No entanto, os dados deste estudo estendem ainda mais este resultado, mostrando que a fadiga pode preceder o desgaste muscular. A diminuição da atividade locomotora do grupo PDX12 - NT (semelhante ao grupo PDX08 - NT), denota que a associação entre redução da atividade física e fadiga pode levar à perda de função muscular que, por sua vez, pode acelerar a perda progressiva de massa muscular com aumento do risco de desenvolver caquexia (Montero-Fernández et al., 2013). A atrofia muscular induzida por desuso tem sido extensivamente explorada e tem se mostrado estar diretamente relacionado a perda de massa muscular e inflamação de baixo grau (Rudrappa et al., 2016). Além disso, breves períodos de inatividade podem alterar a sinalização muscular que regula o metabolismo e o turnover proteico (Jackman et al., 2004). Sendo assim, postulamos que a redução prévia da atividade física contribui para a diminuição da função muscular, conduzindo a progressão da caquexia.

Dada a natureza complexa da fadiga na caquexia do câncer, é apropriado utilizar diferentes abordagens para medir as deficiências do músculo esquelético em estudos pré-clínicos, incluindo o engajamento ou motivação voluntária (Clark et al., 2015). Interessantemente, um estudo relatou que camundongos com tumor não demonstraram "fadiga" avaliada pelos níveis de atividade locomotora em campo aberto, mas demonstraram "fadiga" avaliada pelo tempo gasto imóvel durante um teste de suspensão da cauda usado para imitar o comportamento depressivo (Yang et al., 2014). Em consonância com esses estudos, nossos resultados sugerem que o aumento do tempo imóvel e a atenuação do caráter exploratório podem estar

associados ao comportamento desmotivado, depressivo e desempenho prejudicado no teste de campo aberto. Quanto ao comportamento depressivo, ele pode se apresentar como depressão reativa, que ocorre em resposta a um acontecimento desfavorável, ou depressão endógena, quando se trata de um transtorno psiquiátrico (Berton et al., 2021). A depressão e o estresse têm sido associados à progressão do tumor em estudos clínicos (Sanzo et al., 2010). Neste teste, a imobilidade é interpretada como comportamento de desesperança, sintoma depressivo comum em pacientes, além do fato de que a maioria dos antidepressivos reduz a imobilidade, estimulando o comportamento ativo (Berton et al., 2021). Uma vez que a fadiga relacionada ao câncer pode estar associada ao humor deprimido, esses achados destacam a importância da combinação de testes funcionais para avaliar de forma abrangente os aspectos centrais e periféricos da fadiga muscular em modelos animais de caquexia do câncer.

O comportamento é um fator adicional envolvido na progressão da caquexia. Em humanos, depressão, ansiedade e arrependimento na tomada de decisão estão presentes na maioria dos pacientes com tumores, necessitando tratamento medicamentoso para 25% desses pacientes (Schuermeyer et al., 2016). Muitos estudos investigaram a ocorrência de sintomas físicos em pacientes caquéticos e compararam suas diferenças com pacientes com câncer não caquético, contudo, pouco se sabe sobre as diferenças nos problemas psicológicos entre pacientes com caquexia e sem caquexia. Um estudo recente coletou dados de pacientes hospitalizados com câncer que foram diagnosticados com caquexia e encontrou prevalência de depressão (30,2%), ansiedade (18,6%), depressão grave (6,7%) e ansiedade grave (8,4%) em comparação com pacientes com câncer não caquético (15,2%; 11,1%; 0,8% e 1,6%) (Sun H et al., 2020). A ansiedade pode ocorrer de forma independente ou coexistir com a depressão, e esses distúrbios psicológicos estão fortemente associados a pior qualidade de vida e prognóstico do câncer, podendo levar a maior risco de mortalidade (Grotmol et al., 2017). Em camundongos com caquexia, por meio de observações qualitativas, há a percepção de que eles se comportam de forma diferente dos animais saudáveis, gerando interesse em aplicar testes comportamentais para mensurar esses comportamentos. Nos modelos comportamentais, os animais são expostos a estímulos externos capazes de provocar comportamentos defensivos e ansiolíticos, onde a ansiedade pode ser medida uma

resposta ao sentimento de aversão, um comportamento incontrollável (Berton et al., 2021). Ainda que medir a ansiedade em modelos animais seja muito mais complexo do que usar um único parâmetro em um único ambiente, o comportamento de se aproximar da parede é observado na maioria das espécies de roedores e está associado a comportamentos relacionados à ansiedade. Na realidade, é mais provável que esteja ligado à propensão subjacente de evitar grandes áreas abertas ou áreas de perigo (Seibenhener et al., 2015). Portanto, a identificação e o manejo dos problemas psicológicos na caquexia são extremamente importantes mesmo em modelos animais. Em consonância com esses achados, realizamos um teste para mensurar o tempo gasto no centro e na periferia do campo aberto, com intuito de avaliar comportamentos ansiolíticos. Neste teste constatamos que os camundongos saudáveis atravessam as áreas centrais do campo aberto com uma frequência muito maior do que os camundongos portadores de PDA que passam mais tempo nas regiões periféricas, indicando um comportamento mais defensivo. Consequentemente, concluímos que os camundongos com caquexia induzida por PDA exibem comportamento associado à ansiedade.

Além de apresentar redução na massa muscular e níveis reduzidos de atividade física, os modelos animais também devem demonstrar perda de força muscular para serem adequadamente representativos da condição clínica. O teste de suspensão de quatro membros representa um método para avaliar a força muscular usando todos os quatro membros e determinar a condição geral ao longo do tempo (Deacon, 2013). O teste tem como propósito demonstrar o comprometimento neuromuscular e coordenação motora de modelos de camundongos com distúrbios neuromusculares. Contudo, vale salientar que devido à natureza do teste, não é possível relacionar o resultado a um único efeito. Já a realização recorrente desse teste se faz interessante pois pode ser usado para determinar o curso natural da doença neuromuscular ou a eficácia das abordagens de tratamento farmacológico (Carlson et al., 2010). No teste de suspensão, em contraste com o grupo controle, os resultados demonstram que camundongos PDX08 - NT apresentam pico médio de sustentação em 6 semanas, com posterior redução progressiva ao longo dos 60 dias de experimento. Curiosamente, os camundongos PDX12 - NT também apresentam redução progressiva acentuada do tempo médio de sustentação em comparação com

camundongos saudáveis, atingindo valores semelhantes ao grupo PDX08 - NT na última semana.

Comportamento, equilíbrio e peso podem influenciar o teste de suspensão. Apesar da condição física debilitada de alguns animais devido à progressão da caquexia, os resultados indicam que os camundongos estavam claramente dispostos a realizar o teste, pois o comportamento indica que não há intenção de se desprender da grade. Contudo, como o tempo de suspensão (TS) não leva em consideração a massa corporal do animal, torna-se interessante correlacionar o peso corporal e o TS para avaliar a influência potencial da massa corporal no impulso de retenção (IR) ($IR = \text{Peso corporal} \times TS$). O teste de tempo de suspensão não é uma medida de geração de tensão física, pois envolve a manutenção da força mínima necessária para se opor à força gravitacional (van Putten et al., 2010), logo, o impulso de retenção é uma medida dessa força sustentada. Essa correlação se faz interessante, pois pode fornecer informações importantes sobre a evolução caquexia e sua relação com a capacidade de produzir tensão sustentada nos flexores dos membros. Curiosamente, tanto os camundongos PDX08 - NT quanto os PDX12 - NT apresentaram baixos valores de impulso de retenção ainda que apresentem grandes diferenças no peso corporal total (diferença de 6,5 g aproximadamente), ou seja, os camundongos dos dois grupos são igualmente capazes de se opor à força gravitacional, sugerindo que o peso corporal não é fator decisivo na manutenção da força durante o teste de suspensão.

Em associação com os resultados de campo aberto, acreditamos que o comprometimento muscular ocasionado pelo avanço natural da doença neuromuscular (até mesmo no PDX12) é um fator preditivo do desfecho clínico de pacientes caquéticos e destaca a importância da utilização deste teste para avaliar o declínio na função muscular ao longo do tempo em modelos animais de caquexia do câncer, mesmo em estágios precoces, onde a perda de peso ainda não é evidente. Neste contexto, o teste de suspensão torna-se interessante devido à fácil realização, pela aplicabilidade em camundongos de diferentes idades e por permitir a indução de tensão física sem influenciar o curso natural da caquexia. Contudo, salienta-se a importância do uso de uma combinação de vários testes para obter um panorama mais completo e, assim, uma melhor percepção da função muscular dos grupos experimentais.

Embora a perda muscular induzida por fragmentos de tumor PDA em camundongos pareça modelar de forma fiel a caquexia observada em pacientes humanos, este modelo não é isento de limitações. Uma primeira limitação se deve ao estudo ter sido realizado com PDXs gerados a partir de pacientes falecidos; portanto, não foi possível obter informações adicionais de acompanhamento clínico para corroborar ainda mais os dados obtidos nos animais. Segundo, é possível que as características observadas nos camundongos sejam seletivas para PDA e, portanto, tenham menos aplicabilidade para estudar outros tipos de tumores que também promovem a caquexia. Apesar dessas limitações, o presente estudo é, até onde sabemos, o primeiro estudo a gerar modelos animais de caquexia com fragmentos sólidos do mesmo tipo de tumor, contudo, oriundos de pacientes diferentes. Além disso, juntamente aos dados bioquímicos, foram realizados testes de função muscular. Esses resultados têm uma importância significativa, uma vez que os pacientes com caquexia do câncer frequentemente apresentam sérios comprometimentos funcionais, incluindo redução da mobilidade e atividade física. No presente estudo, descrevemos uma variedade de testes que abrangem os mesmos comprometimentos funcionais vivenciados por pacientes com caquexia, incluindo avaliações de força sustentada, desempenho locomotor e comportamento exploratório. Por fim, destacamos o modelo de camundongo com PDA como um avanço em relação aos modelos animais existentes de caquexia, e antecipamos que esse modelo se mostrará uma ferramenta útil para aprimorar a compreensão dos mecanismos subjacentes à perda de tecido e traduzir esse conhecimento em novas terapias anti-caquéticas.

5.2. Parte 2: Perspectivas para prevenção e tratamento da caquexia com Bj-PRO-10c

Os avanços na compreensão da caquexia do câncer, em particular a patogênese da caquexia induzida pelo câncer pancreático, nos dão informações prognósticas e mecanísticas importantes na identificação de potenciais alvos terapêuticos; no entanto, as opções farmacológicas atuais para caquexia são limitadas. Contudo, um número limitado de estudos pré-clínicos tentou investigar a fisiopatologia da caquexia induzida por PDA e a eficácia de intervenções anticaquéticas em modelos com tumor. O elevado número de grupos experimentais necessários por esta abordagem limita o potencial de tais estudos projetados para investigar em detalhes o fenótipo caquético induzido por câncer. O presente estudo foi projetado para superar essas limitações e a impossibilidade inerente de administrar agentes bioativos em humanos, fornecendo uma caracterização multimodal abrangente de dois modelos caquéticos induzidos pelo mesmo tipo de tumor humano. Portanto, como segundo objetivo principal deste estudo, examinamos a trajetória da caquexia ao longo do tempo, e sua relação com o tratamento crônico com Bj-PRO-10c.

Para investigar o suposto efeito anti-caquético do peptídeo na homeostase muscular, uma investigação dos efeitos dessa droga no catabolismo muscular foi conduzida. Os dados apresentados demonstram que o Bj-PRO-10c tem efeitos protetores contra vários componentes da fisiopatologia da caquexia induzida por PDA, incluindo perda de peso, atrofia muscular, empobrecimento do tecido adiposo e estresse oxidativo. Em linhas gerais, demonstramos *in vitro* que o decapeptídeo Bj-PRO-10c (10 μ M) foi capaz de reduzir significativamente a produção do ânion superóxido em células precursoras de mioblastos em meios condicionados de células tumorais humanas de câncer de pâncreas (PDA08 e MIA PaCa-2), sem alterar a viabilidade das células C2C12. *In vivo*, o peptídeo exerceu um efeito protetivo robusto contra a perda de peso corporal total e evitou que essa perda se agravasse na fase mais avançada da doença. Aqui, mostramos que o Bj-PRO-10c (1 μ g de Bj-PRO-10c por grama de peso corporal a cada 72h) atenua em aproximadamente 5% a perda de peso corporal no modelo de caquexia grave, PDX08, sem afetar o crescimento do

tumor. Traçando um paralelo com a realidade humana, caso estivéssemos falando de um paciente com 80kg, tal diferença representa 4kg a mais em relação ao paciente não tratado. Além disso, o tratamento crônico com o Bj-PRO-10c foi capaz de aumentar a distância percorrida no grupo PDX08 na última semana do período experimental. Todos esses achados se apresentam como possíveis efeitos protetores do Bj-PRO-10c contra caquexia, sendo capaz de atenuar a perda de peso, degradação da massa muscular e tecido adiposo, redução de mobilidade e termogênese de camundongos xenoenxertados com PDA humano.

Ainda que a patogênese exata da caquexia não tenha sido completamente elucidada, evidências crescentes indicam de que o estresse oxidativo desempenha um papel crucial no desenvolvimento da condição. O estresse oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a capacidade das células de neutralizá-las. Dentro deste contexto, é amplamente conhecido que as ROS regulam uma variedade de processos celulares associados ao câncer, incluindo resposta ao dano do DNA, proliferação celular, adesão, migração e sinalização de morte celular. No entanto, a produção excessiva de ROS, especialmente do ânion superóxido, pode levar ao estresse oxidativo e à instabilidade genômica, promovendo o crescimento e a progressão do tumor. Dentre os ROS, a superprodução do superóxido é fortemente induzida pela caquexia, implicado na disfunção mitocondrial e a ativação do sistema ubiquitina-proteassoma, que resulta em degradação excessiva de proteínas musculares. Portanto, um equilíbrio adequado entre a produção e a degradação de ROS é essencial para a manutenção da homeostase celular e para evitar danos celulares e genômicos. Estudos anteriores, como os de Kate et al. (2006) e López-Lázaro (2007), destacaram a importância de uma regulação fina das taxas de produção e degradação de ROS, especialmente do ânion superóxido, para modular o destino e a plasticidade das células tumorais. Em linha com esses resultados, demonstramos o potencial antioxidante do Bj-PRO-10c por reduzir a produção de superóxido em mioblastos quando submetidos ao meio condicionado de células de câncer pancreático. Ainda que o tratamento não tenha alterado a produção de superóxido de mioblastos que se encontram em condições normais, nossos dados indicam que o Bj-PRO-10c pode ter efeitos protetores contra o estresse oxidativo induzido pelo desenvolvimento da caquexia associada ao PDA.

Como a inflamação é a principal força motriz por trás das alterações metabólicas no paciente caquético, investigamos o potencial dos efeitos anti-inflamatórios do peptídeo Bj-PRO-10c. Postulamos que os mecanismos relacionados com os dois alvos moleculares do Bj-PRO-10c, ECA e ASS, podem estar envolvidos com a proteção induzida pelo peptídeo contra os efeitos sistêmicos da caquexia. Primeiro, a atenuação da caquexia e a perda do músculo esquelético nos camundongos tratados pode ser parcialmente explicada pela redução da produção de angiotensina II (Ang II). Desde a descoberta do Captopril no século passado, diversos estudos demonstraram o potencial dos peptídeos potenciadores da bradicinina em inibir a enzima conversora de angiotensina (ECA), que é responsável pela conversão da angiotensina I no vasoconstritor ativo angiotensina II (Lameu et al., 2010). Múltiplos mecanismos complexos estão associados a produção exacerbada de Ang II, incluindo a intensificação da produção de citocinas pró-inflamatórias (especialmente IL-6 e TNF- α), aumento do estresse oxidativo (via ROS), interrupção da sinalização de insulina, redução dos níveis de ATP, elevação da degradação de proteínas (via UPS) e modulação da sensação de apetite e saciedade (Yoshida et al., 2013). Traçando um paralelo com clínica, pacientes humanos com caquexia cardíaca também apresentam níveis elevados de angiotensina II, aumentando os níveis das citocinas pró-inflamatórias (Zhang et al., 2009; Brink et al., 2001). Por reduzir os efeitos dos mecanismos supracitados, a inibição da ECA e consequentemente, redução de Ang II, se apresenta como estratégia importante no tratamento da caquexia.

Segundo, além de ter como alvo molecular a ECA, o Bj-PRO-10c também é conhecido por aumentar a atividade da ASS e sustentar a produção controlada de óxido nítrico, garantindo a biodisponibilidade adequada dessa molécula para o funcionamento fisiológico adequado. Nesse cenário, estudos do nosso grupo de pesquisa demonstraram que o peptídeo é capaz de promover a ativação da ASS, resultando no aumento da produção do metabólito óxido nítrico e concentração plasmática de arginina (Guerreiro et al., 2009; Lameu et al., 2012; de Oliveira et al., 2010). Em adição, diversas evidências têm sugerido o óxido nítrico como um sistema de defesa antioxidante essencial para a manutenção da homeostase oxidativa celular. Interessantemente, demonstrou-se que a oxidação de proteínas e expressão de ligases foram menores nos músculos oxidativos e que estes músculos apresentam maior produção de NO e expressão de genes oxidantes, tornando-os mais resistentes

a degradação muscular promovida pela caquexia (Yu et al., 2008). À vista desses mecanismos, esses argumentos reforçam a importância do NO como um potencial protetor e modulador dos danos promovidos pela caquexia, devido à maior produção de NO por músculos oxidativos em comparação com músculos glicolíticos. Além do status antioxidante, o óxido nítrico também apresenta implicações no equilíbrio pró-inflamatório das citocinas. Conforme discutido anteriormente, a regulação positiva dos genes inflamatórios e a liberação de citocinas está intimamente relacionada com a ativação intracelular do fator de transcrição NF- κ B. Estudos sugerem que o NO pode ser importante na regulação da intensidade e duração da ativação de citocinas pró-inflamatórias por estabilizar o I κ B, a proteína principal responsável pelo controle da ativação do NF- κ B (Arias et al., 2011). Esse pode ser um aspecto importante proteção da mediada pelo NO e reforça a importância do NO como potencial mediador e modulador de danos induzidos pela caquexia do câncer.

Demonstramos que o tratamento com Bj-PRO-10c aumentou significativamente a massa lipídica com concomitante redução da expressão do gene *Ucp1*, diminuindo o gasto energético e a mobilização de lipídios. Postula-se que Bj-PRO-10c previna o dano oxidativo nas gotículas lipídicas dos adipócitos por meio de sua atividade antioxidante, reduzindo o desgaste acentuado dos adipócitos. O estímulo da atividade lipolítica, provocada pela progressão da caquexia, induz a produção de quantidades excessivas de superóxido e peróxido de hidrogênio, gerando ROS altamente tóxicos. Adicionalmente, a angiotensina II também está documentada por estimular a NADPH oxidase, levando ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, que podem ativar a via do NF- κ B e a produção de citocinas pró-inflamatórias (Wei et al., 2008). Logo, considera-se que o peptídeo suprime a sinalização inflamatória, como a via NF- κ B, por reduzir esses tipos de ROS no tecido adiposo através do estímulo da produção de NO com concomitante inibição da formação de Ang II, o que poderia explicar por que o tratamento aumenta a massa do tecido adiposo, além de reduzir a expressão de marcadores termogênicos em camundongos caquéticos com PDA.

Em linhas gerais, o PDA causou perda substancial de massa muscular esquelética, consistente com a superexpressão de genes catabólicos, todavia, o tratamento crônico com o peptídeo melhorou a perda de massa magra nos músculos dominantes de fibra de contração rápida em praticamente 25%, reduziu a expressão

dos marcadores de catabolismo e reverteu complemente a atrofia cardíaca no modelo PDX08. Supõe-se que a caquexia induzida por PDA causa estresse oxidativo ao tecido normal e afeta diretamente os músculos esqueléticos e a fadiga. Algumas vias possíveis incluem a geração de ROS que estimula a regulação ascendente de proteínas musculares específicas (ubiquitina E3 ligases) por meio da via do proteassoma e a formação de espécies reativas de oxigênio no músculo estimulando a apoptose de miócitos esqueléticos (Egerman et al., 2014). À vista disso, a proteção do tecido muscular exercida pelo tratamento com Bj-PRO-10c deve-se a sua ação em atenuar o estresse oxidativo, pela redução da produção de ROS, e, por conseguinte suprime a ativação da sinalização a partir de fatores de transcrição como NF- κ B, que tem como alvos os genes que regulam o sistema ubiquitina-proteassoma, *Atrogin-1* e *MuRF1*. Uma vez que existem processos hipoanabólicos e hipercatabólicos em ação na caquexia de forma multifatorial, acreditamos que seja prudente estudar os efeitos da combinação de um agente anabólico juntamente com efeitos anti-catabólicos do Bj-PRO-10c para promover a qualidade de vida e aumentar a expectativa de vida dos pacientes.

O Bj-PRO-10c, por si só, pode ser um composto natural altamente promissor com potencial terapêutico para prevenir o desenvolvimento da caquexia induzida por câncer, com base em descobertas recentes em roedores. Resultados empolgantes do nosso laboratório com o Bj-PRO-10c, mostraram um efeito do peptídeo na prevenção da caquexia induzida por neuroblastoma em modelo animal. Resumidamente, camundongos atímicos BALB/c nude foram injetados subcutaneamente com tumoresferas de neuroblastoma presença ou ausência do tratamento com Bj-PRO-10c. O tamanho do tumor e o peso corporal foram monitorados por 90 dias a cada 2 dias. Após o período experimental, o grupo controle perdeu cerca de 25% do peso corporal total e massa muscular esquelética, enquanto os animais que receberam tumoresferas tratadas com o peptídeo, mantiveram seu peso corporal e massa muscular durante todo o ciclo. Observou-se também que o tamanho e o volume dos tumores não foram significativamente diferentes entre os grupos, indicando que o mecanismo de ação subjacente a proteção dos animais contra a síndrome de emagrecimento muscular não está relacionada ao crescimento do tumor. Esses dados foram consistentes e reprodutíveis nesses modelos animais de caquexia do câncer infantil, sugerindo fortemente que, quando em contato com tumores precoces, o Bj-

PRO-10c induz um mecanismo de ação que tem uma maneira eficaz de proteger os animais contra a síndrome de emagrecimento muscular. Contudo, uma vez que essas tumoresferas foram primeiramente tratadas com o peptídeo para posterior aplicação subcutânea, torna difícil relacionar os efeitos do composto nos casos em que as células são previamente tratadas (modelo neuroblastoma) e quando o Bj-PRO-10c é inoculado sistemicamente via intraperitoneal após o xenotransplante (modelo PDA). Em vista disso, os dados apresentados demonstram que a biodisponibilidade local pode não refletir adequadamente a biodisponibilidade sistêmica, portanto o aprimoramento da formulação e de *drug delivery* do peptídeo Bj-PRO-10c constitui uma excelente estratégia que visa melhorar o desempenho do peptídeo, bem como abre caminho para o patenteamento para eventuais usos comerciais futuros. No entanto, apesar da heterogeneidade e do estágio avançado da doença, o tratamento com Bj-PRO-10c resultou em benefício clínico, conforme demonstrado por melhorias estatisticamente significativas na composição corporal magra e marcadores bioquímicos.

A dose adequada e a frequência correta de administração do tratamento também desempenham um papel fundamental na influência dos efeitos terapêuticos observados. Se a dose for muito baixa ou a frequência for inadequada, pode resultar em uma resposta terapêutica insuficiente, levando a resultados negativos ou ausência de benefícios clínicos significativos. Por outro lado, doses muito altas ou frequência excessiva podem levar a efeitos colaterais indesejados ou até mesmo toxicidade, afetando a validade dos resultados (Powell et al., 2021). Além disso, também podem afetar a farmacocinética (absorção, distribuição, metabolismo e eliminação do medicamento) e a farmacodinâmica (mecanismos de ação e efeitos no organismo). Alterações nesses parâmetros podem levar a variações na concentração do medicamento no corpo, na sua eficácia e na sua interação com o alvo biológico (Mager et al., 2003). Isso pode resultar em diferentes resultados clínicos e afetar a interpretação dos dados obtidos na pesquisa. À vista disso, é essencial definir cuidadosamente a dose e frequência do tratamento a ser investigado, levando em consideração fatores como a eficácia esperada, segurança, farmacocinética e farmacodinâmica. A padronização desses parâmetros é crucial para garantir a validade dos resultados obtidos na pesquisa e sua relevância clínica.

Ainda que “qualidade de vida” seja difícil de definir, uma vez que depende do desenho, condução e análise de um ensaio, sua relevância clínica e a qualidade dos relatórios, este estudo revelou que o tratamento crônico pode resultar em sobrevida prolongada e melhorias clinicamente significativas na qualidade de vida de pacientes com caquexia induzida por PDA. Nossos dados, portanto, apoiam o desenvolvimento ou implementação de intervenções que visam diminuir ou reverter as perdas induzidas pelo PDA, com o objetivo de atrasar ou prevenir a progressão da caquexia e os resultados clínicos ruins associados. Esta recomendação está de acordo com vários estudos anteriores, que descreveram que os pacientes durante o curso inicial da doença metastática ainda podem ter potencial anabólico explorável (Prado et al., 2013; Kurk et al., 2018; Winter et al., 2012). Por fim, todos os dados apresentados mostraram-se interessantes e exibem potencial de serem mais aprofundados à vista de compreendermos os motivos que sustentam a maior agressividade de alguns tumores em relação a outros. Estas informações dão suporte para o uso de modelos PDX como uma estratégia para estudar o perfil único de cada xenotumor e assim, abrindo oportunidades para investigar a eficácia de compostos, como o Bj-PRO-10c, que apresentam potencial como agente preventivo ou terapêutico para caquexia, avaliando a reversão dos efeitos sistêmicos observados nessa patologia.

6. CONCLUSÕES

Em conclusão, nossos resultados sugerem que o uso de modelos PDX é uma estratégia relevante para investigar as peculiaridades envolvidas na etiologia e fisiopatologia do PDA que levam à caquexia. Além de ampliar a compreensão dos mecanismos moleculares subjacentes ao crescimento tumoral, ele também fornece um recurso valioso para uma ampla variedade de abordagens básicas e translacionais em estudos futuros. Nossos dados mostram que os camundongos portadores de PDA humano imitaram as deficiências metabólicas e funcionais observadas em pacientes com a doença, destacando sua adequação como modelos animais apropriados de caquexia do câncer. Os camundongos portadores de tumor PDA podem ser usados para delinear a relação entre caquexia e tumores e estudar estágios distintos da caquexia do câncer. A utilização de avaliações funcionais e metabólicas melhorará a tradução dos resultados para a clínica e ajudará a encontrar intervenções terapêuticas para a caquexia do câncer que melhorem a qualidade de vida do paciente e reduzam a mortalidade.

Em adição, no presente trabalho apresentamos o Bj-PRO-10c como uma nova molécula com potencial terapêutico para prevenir e tratar a caquexia do câncer induzida por PDA. Esse estudo fornece dados valiosos sobre os níveis de exposição do peptídeo e alterações metabólicas da administração crônica, abrindo caminho para novas investigações, visto que a caquexia é uma síndrome muito debilitante para pacientes com câncer e ainda não há nenhuma terapia em uso clínico com efeitos comprovados. Os resultados deste estudo, que demonstram a eficácia de uma abordagem de tratamento com múltiplos alvos, parecem confirmar a hipótese fundamental de que o tratamento da caquexia do câncer, uma síndrome multifatorial, tem maior probabilidade de ser bem-sucedido com uma abordagem multidimensional. Finalmente, e acima de tudo, o desenvolvimento do Bj-PRO-10c como uma droga para o tratamento da caquexia do câncer será extremamente impactante na clínica médica para combater essa doença silenciosa, pois pode melhorar a qualidade de vida e aumentar a expectativa de vida dos pacientes, além de diminuir custos com hospitalizações, complicações secundárias e, o mais importante, casos de mortes em todo o mundo.

7. REFERÊNCIAS

Abadi A, Glover EI, Isfort RJ, et al. Limb immobilization induces a coordinate down-regulation of mitochondrial and other metabolic pathways in men and women. *PLoS One*. 2009; 4(8): e6518.

Ábrigo J, Elorza AA, Riedel CA, et al. Role of Oxidative Stress as Key Regulator of Muscle Wasting during Cachexia. *Oxid Med Cell Longev*. 2018; 2018: 2063179.

Acharyya S, Butchbach ME, Sahenk Z, et al. Dystrophin glycoprotein complex dysfunction: a regulatory link between muscular dystrophy and cancer cachexia. *Cancer Cell*. 2005; 8(5): 421-432.

Acharyya S, Ladner KJ, Nelsen LL, et al. Cancer cachexia is regulated by selective targeting of skeletal muscle gene products. *J Clin Invest*. 2004; 114(3): 370-378.

Ahlberg K, Ekman T, Gaston-Johansson F, Mock V. Assessment and management of cancer-related fatigue in adults. *Lancet*. 2003; 362(9384): 640-650.

Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100(7): 3983-3988.

Alimoradi H, Greish K, Gamble AB, Giles GI. Controlled Delivery of Nitric Oxide for Cancer Therapy. *Pharm Nanotechnol*. 2019; 7(4): 279-303.

Alteri E, Guizzaro L. Be open about drug failures to speed up research. *Nature*. 2018; 563(7731): 317-319.

Anderson EJ, Neuffer PD. Type II skeletal myofibers possess unique properties that potentiate mitochondrial H₂O₂ generation. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2006; 290(3): C844-C851.

Andreyev AY, Kushnareva YE, Starkov AA. Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry (Mosc)*. 2005; 70(2): 200-214.

Aoyagi T, Terracina KP, Raza A, Matsubara H, Takabe K. Cancer cachexia, mechanism and treatment. *World J Gastrointest Oncol*. 2015; 7(4): 17-29.

Apelgren KN, Wilmore DW. Parenteral nutrition: is it oncologically logical? A response. *J Clin Oncol*. 1984; 2(5): 539-541.

Argilés JM, Busquets S, Stemmler B, López-Soriano FJ. Cancer cachexia: understanding the molecular basis. *Nat Rev Cancer*. 2014; 14(11): 754-762.

Argilés JM, Busquets S, Toledo M, López-Soriano FJ. The role of cytokines in cancer cachexia. *Curr Opin Support Palliat Care*. 2009; 3(4): 263-268.

Argilés JM, Lopez-Soriano FJ, Busquets S. Counteracting inflammation: a promising therapy in cachexia. *Crit Rev Oncog*. 2012; 17(3): 253-262.

Arias-Salvatierra D, Silbergeld EK, Acosta-Saavedra LC, Calderon-Aranda ES. Role of nitric oxide produced by iNOS through NF- κ B pathway in migration of cerebellar granule neurons induced by Lipopolysaccharide. *Cell Signal*. 2011; 23(2): 425-35.

Arruda AP, Milanski M, Romanatto T, et al. Hypothalamic actions of tumor necrosis factor alpha provide the thermogenic core for the wastage syndrome in cachexia. *Endocrinology*. 2010; 151(2): 683-694.

Arthur ST, Noone JM, Van Doren BA, Roy D, Blanchette CM. One-year prevalence, comorbidities and cost of cachexia-related inpatient admissions in the USA. *Drugs Context*. 2014; 3: 212265.

Aulino P, Berardi E, Cardillo VM, et al. Molecular, cellular and physiological characterization of the cancer cachexia-inducing C26 colon carcinoma in mouse. *BMC Cancer*. 2010; 10: 363.

Austin S, St-Pierre J. PGC1 α and mitochondrial metabolism--emerging concepts and relevance in ageing and neurodegenerative disorders. *J Cell Sci*. 2012; 125(Pt 21): 4963-4971.

Bachmann J, Heiligensetzer M, Krakowski-Roosen H, Büchler MW, Friess H, Martignoni ME. Cachexia worsens prognosis in patients with resectable pancreatic cancer. *J Gastrointest Surg*. 2008; 12(7): 1193-1201.

Bachmann J, Ketterer K, Marsch C, et al. Pancreatic cancer related cachexia: influence on metabolism and correlation to weight loss and pulmonary function. *BMC Cancer*. 2009; 9: 255.

- Baltgalvis KA, Berger FG, Pena MM, Davis JM, Muga SJ, Carson JA. Interleukin-6 and cachexia in ApcMin/+ mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2008; 294(2): R393-R401.
- Baracos VE, Le Bricon T. Animal models for nutrition in cancer. *Nestle Nutr Workshop Ser Clin Perform Programme*. 2000; 4: 167-182.
- Baracos VE, Martin L, Korc M, Guttridge DC, Fearon KCH. Cancer-associated cachexia. *Nat Rev Dis Primers*. 2018; 4: 17105.
- Barreiro E, de la Puente B, Busquets S, López-Soriano FJ, Gea J, Argilés JM. Both oxidative and nitrosative stress are associated with muscle wasting in tumour-bearing rats. *FEBS Lett*. 2005; 579(7): 1646-1652.
- Barton BE, Murphy TF. Cancer cachexia is mediated in part by the induction of IL-6-like cytokines from the spleen. *Cytokine*. 2001; 16(6): 251-257.
- Ben-David U, Ha G, Tseng YY, et al. Patient-derived xenografts undergo mouse-specific tumor evolution. *Nat Genet*. 2017; 49(11): 1567-1575.
- Bennani-Baiti N, Walsh D. Animal models of the cancer anorexia-cachexia syndrome. *Support Care Cancer*. 2011; 19(9): 1451-1463.
- Berton J, Ferreira TN, Santos NP, Ferro MM, Favero GM. Evaluation of Depressive and Anxious Behavior with the Use of Propranolol in Melanoma-Bearing Mice. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2021; 64: e21200428.
- Bigham-Sadegh A, Oryan A. Selection of animal models for pre-clinical strategies in evaluating the fracture healing, bone graft substitutes and bone tissue regeneration and engineering. *Connect Tissue Res*. 2015; 56(3): 175-194.
- Bilir C, Engin H, Can M, Temi YB, Demirtas D. The prognostic role of inflammation and hormones in patients with metastatic cancer with cachexia. *Med Oncol*. 2015; 32(3): 56.
- Bing C, Trayhurn P. Regulation of adipose tissue metabolism in cancer cachexia. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2008; 11(3): 201-207.

- Biondi A, Lirosi MC, D'Ugo D, et al. Neo-adjuvant chemo(radio)therapy in gastric cancer: Current status and future perspectives. *World J Gastrointest Oncol.* 2015; 7(12): 389-400.
- Blum D, Stene GB, Solheim TS, et al. Validation of the Consensus-Definition for Cancer Cachexia and evaluation of a classification model--a study based on data from an international multicentre project (EPCRC-CSA). *Ann Oncol.* 2014; 25(8): 1635-1642.
- Bodine SC, Baehr LM. Skeletal muscle atrophy and the E3 ubiquitin ligases MuRF1 and MAFbx/atrogen-1. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2014; 307(6): E469-E484.
- Bonaldo P, Sandri M. Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy. *Dis Model Mech.* 2013; 6(1): 25-39.
- Bond-Smith G, Banga N, Hammond TM, Imber CJ. Pancreatic adenocarcinoma. *BMJ.* 2012; 344: e2476
- Bonetto A, Aydogdu T, Kunzevitzky N, et al. STAT3 activation in skeletal muscle links muscle wasting and the acute phase response in cancer cachexia. *PLoS One.* 2011; 6(7): e22538.
- Bonetto A, Rupert JE, Barreto R, Zimmers TA. The Colon-26 Carcinoma Tumor-bearing Mouse as a Model for the Study of Cancer Cachexia. *J Vis Exp.* 2016; (117): 54893.
- Bonuccelli G, Tsirigos A, Whitaker-Menezes D, et al. Ketones and lactate "fuel" tumor growth and metastasis: Evidence that epithelial cancer cells use oxidative mitochondrial metabolism. *Cell Cycle.* 2010; 9(17): 3506-3514.
- Bosaeus I, Daneryd P, Svanberg E, Lundholm K. Dietary intake and resting energy expenditure in relation to weight loss in unselected cancer patients. *Int J Cancer.* 2001; 93(3): 380-383.
- Bossola M, Muscaritoli M, Costelli P, et al. Increased muscle proteasome activity correlates with disease severity in gastric cancer patients. *Ann Surg.* 2003; 237(3): 384-389.

- Braganza JM. The Pancreas: Biology, Pathobiology and Disease. *Gut*. 1994; 35(3): 431-432.
- Brand MD, Affourtit C, Esteves TC, et al. Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins. *Free Radic Biol Med*. 2004; 37(6): 755-767.
- Braun TP, Zhu X, Szumowski M, et al. Central nervous system inflammation induces muscle atrophy via activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *J Exp Med*. 2011; 208(12): 2449-2463.
- Brink M, Price SR, Chrast J, Bailey JL, Anwar A, Mitch WE, Delafontaine P. Angiotensin II induces skeletal muscle wasting through enhanced protein degradation and down-regulates autocrine insulin-like growth factor I. *Endocrinology*. 2001; 142(4): 1489-96.
- Bronte V, Pittet MJ. The spleen in local and systemic regulation of immunity. *Immunity*. 2013; 39(5): 806-18.
- Brown JK. A systematic review of the evidence on symptom management of cancer-related anorexia and cachexia. *Oncol Nurs Forum*. 2002; 29(3): 517-532.
- Bruera E, Sweeney C. Cachexia and asthenia in cancer patients. *Lancet Oncol*. 2000; 1: 138-147.
- Buccheri G, Ferrigno D, Tamburini M. Karnofsky and ECOG performance status scoring in lung cancer: a prospective, longitudinal study of 536 patients from a single institution. *Eur J Cancer*. 1996; 32A(7): 1135-1141.
- Bugrim A, Nikolskaya T, Nikolsky Y. Early prediction of drug metabolism and toxicity: systems biology approach and modeling. *Drug Discov Today*. 2004; 9(3): 127-35.
- Buijs N, Luttikhoud J, Houdijk AP, van Leeuwen PA. The role of a disturbed arginine/NO metabolism in the onset of cancer cachexia: a working hypothesis. *Curr Med Chem*. 2012; 19(31): 5278-5286.
- Burton GJ, Jauniaux E. Oxidative stress. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2011; 25(3): 287-299.

Busiello RA, Savarese S, Lombardi A. Mitochondrial uncoupling proteins and energy metabolism. *Front Physiol.* 2015; 6: 36.

Cadenas E, Davies KJ. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med.* 2000; 29(3-4): 222-230.

Caglar K, Kutluk T, Varan A, Koray Z, Akyüz C, Yalçın B, Erbaş B, Büyükpamukçu M. Leptin and neuropeptide Y plasma levels in children with cancer. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2005; 18(5): 485-9.

Calles, Rubio-Viqueira, Hidalgo. Primary Human Non-Small Cell Lung and Pancreatic Tumorgraft Models—Utility and Applications in Drug Discovery and Tumor Biology. *Curr Protoc Pharmacol.* 2013; Chapter 14: Unit 14.26.

Cao PR, Kim HJ, Lecker SH. Ubiquitin-protein ligases in muscle wasting. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005; 37(10): 2088-2097.

Carey RM, Wang ZQ, Siragy HM. Role of the angiotensin type 2 receptor in the regulation of blood pressure and renal function. *Hypertension.* 2000; 35(1 Pt 2): 155-163.

Carlson CG, Rutter J, Bledsoe C, et al. A simple protocol for assessing inter-trial and inter-examiner reliability for two noninvasive measures of limb muscle strength. *J Neurosci Methods.* 2010; 186(2): 226-30.

Cerami A, Ikeda Y, Le Trang N, Hotez PJ, Beutler B. Weight loss associated with an endotoxin-induced mediator from peritoneal macrophages: the role of cachectin (tumor necrosis factor). *Immunol Lett.* 1985; 11(3-4): 173-177.

Chambers AP, Woods SC. The role of neuropeptide Y in energy homeostasis. *Handb Exp Pharmacol.* 2012; (209): 23-45.

Chan BA, Jang RW, Wong RK, Swallow CJ, Darling GE, Elimova E. Improving Outcomes in Resectable Gastric Cancer: A Review of Current and Future Strategies. *Oncology (Williston Park).* 2016; 30(7): 635-645.

Chance WT, Xiao C, Dayal R, Sheriff S. Alteration of NPY and Y1 receptor in dorsomedial and ventromedial areas of hypothalamus in anorectic tumor-bearing rats. *Peptides.* 2007; 28(2): 295-301.

Chasen M, Bhargava R, Hirschman S. Immunomodulatory agents for the treatment of cachexia. *Curr Opin Support Palliat Care*. 2014; 8(4): 328-333.

Chen C, Xie Z, Shen Y, Xia SF. The Roles of Thyroid and Thyroid Hormone in Pancreas: Physiology and Pathology. *Int J Endocrinol*. 2018; 2018: 2861034.

Cheung HS, Cushman DW. Inhibition of homogeneous angiotensin-converting enzyme of rabbit lung by synthetic venom peptides of *Bothrops jararaca*. *Biochim Biophys Acta*. 1973; 293(2): 451-63.

Clapham JC, Arch JR, Chapman H, et al. Mice overexpressing human uncoupling protein-3 in skeletal muscle are hyperphagic and lean. *Nature*. 2000; 406(6794): 415-418.

Clark YY, Wold LE, Szalacha LA, McCarthy DO. Ubiquinol reduces muscle wasting but not fatigue in tumor-bearing mice. *Biol Res Nurs*. 2015; 17(3): 321-329.

Clarkson RW, Boland MP, Kritikou EA, et al. The genes induced by signal transducer and activators of transcription (STAT)3 and STAT5 in mammary epithelial cells define the roles of these STATs in mammary development. *Mol Endocrinol*. 2006; 20(3): 675-685.

Coleman JW. Nitric oxide in immunity and inflammation. *Int Immunopharmacol*. 2001; 1(8): 1397-406.

Collisson EA, Sadanandam A, Olson P, Gibb WJ, Truitt M, Gu S, Cooc J, Weinkle J, Kim GE, Jakkula L, Feiler HS, Ko AH, Olshen AB, Danenberg KL, Tempero MA, Spellman PT, Hanahan D, Gray JW. Subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma and their differing responses to therapy. *Nat Med*. 2011 Apr;17(4):500-3.

Corrêa TD, Takala J, Jakob SM. Angiotensin II in septic shock. *Crit Care*. 2015; 19(1): 98.

Cosper PF, Leinwand LA. Cancer causes cardiac atrophy and autophagy in a sexually dimorphic manner. *Cancer Res*. 2011;71(5):1710-1720.

Courtney R, Ngo DC, Malik N, Ververis K, Tortorella SM, Karagiannis TC. Cancer metabolism and the Warburg effect: the role of HIF-1 and PI3K. *Mol Biol Rep*. 2015; 42(4): 841-51.

- Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature*. 2002; 420(6917): 860-867.
- Coutinho F, Guimarães LM, Seeger R, Paula J Santos A, Glaser T, Yamamoto D, Lacerda L, Arnaud-Sampaio V, Rossini CV, Rabelo I, Miranda de Medeiros N, Ramos Truzzi D, Aparecida Juliano M, Juliano L, Ulrich H, Lameu C. Bj-PRO-10c, as an allosteric regulator of argininosuccinate synthase, is a potential therapy for neuroblastoma metastasis. *Toxicol*. 2023; 233: 107228.
- Cree IA, Glaysher S, Harvey AL. Efficacy of anti-cancer agents in cell lines versus human primary tumour tissue. *Curr Opin Pharmacol*. 2010; 10(4): 375-379.
- Croker BA, Krebs DL, Zhang JG, et al. SOCS3 negatively regulates IL-6 signaling in vivo. *Nat Immunol*. 2003; 4(6): 540-545.
- Curt GA, Breitbart W, Cella D, et al. Impact of cancer-related fatigue on the lives of patients: new findings from the Fatigue Coalition. *Oncologist*. 2000; 5(5): 353-360.
- Daas SI, Rizeq BR, Nasrallah GK. Adipose tissue dysfunction in cancer cachexia. *J Cell Physiol*. 2018; 234(1): 13-22.
- Dagogo-Jack I, Shaw AT. Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. *Nat Rev Clin Oncol*. 2018; 15(2): 81-94.
- Dahele M, Skipworth RJ, Wall L, Voss A, Preston T, Fearon KC. Objective physical activity and self-reported quality of life in patients receiving palliative chemotherapy. *J Pain Symptom Manage*. 2007; 33(6): 676-685.
- Dahele M, Skipworth RJ, Wall L, Voss A, Preston T, Fearon KC. Objective physical activity and self-reported quality of life in patients receiving palliative chemotherapy. *J Pain Symptom Manage*. 2007; 33(6): 676-685.
- Dahlman I, Mejhert N, Linder K, et al. Adipose tissue pathways involved in weight loss of cancer cachexia. *Br J Cancer*. 2010; 102(10): 1541-1548.
- Damrauer JS, Stadler ME, Acharyya S, Baldwin AS, Couch ME, Guttridge DC. Chemotherapy-induced muscle wasting: association with NF- κ B and cancer cachexia. *Eur J Transl Myol*. 2018; 28(2): 7590.

- de Kloet AD, Krause EG, Kim DH, Sakai RR, Seeley RJ, Woods SC. The effect of angiotensin-converting enzyme inhibition using captopril on energy balance and glucose homeostasis. *Endocrinology*. 2009; 150(9): 4114-4123.
- De Lerma Barbaro A. The complex liaison between cachexia and tumor burden (Review). *Oncol Rep*. 2015; 34(4): 1635-49.
- de Oliveira EF, Guerreiro JR, Silva CA, Benedetti GF, Lebrun I, Ulrich H, Lameu C, Camargo AC. Enhancement of the citrulline-nitric oxide cycle in astrogloma cells by the proline-rich peptide-10c from Bothrops jararaca venom. *Brain Res*. 2010; 1363:11-9.
- de Palma C, Clementi E. Nitric oxide in myogenesis and therapeutic muscle repair. *Mol Neurobiol*. 2012; 46(3): 682-692.
- de Palma L, Marinelli M, Pavan M, Orazi A. Ubiquitin ligases MuRF1 and MAFbx in human skeletal muscle atrophy. *Joint Bone Spine*. 2008; 75(1): 53-57.
- Deacon RM. Measuring the strength of mice. *J Vis Exp*. 2013; (76): 2610.
- DeBoer MD, Zhu XX, Levasseur P, et al. Ghrelin treatment causes increased food intake and retention of lean body mass in a rat model of cancer cachexia. *Endocrinology*. 2007; 148(6): 3004-3012.
- Deboer MD. Animal models of anorexia and cachexia. *Expert Opin Drug Discov*. 2009; 4(11): 1145-1155.
- Depreeuw J, Hermans E, Schrauwen S, et al. Characterization of patient-derived tumor xenograft models of endometrial cancer for preclinical evaluation of targeted therapies. *Gynecol Oncol*. 2015; 139(1): 118-126.
- Dev R. Measuring cachexia-diagnostic criteria. *Ann Palliat Med*. 2019; 8(1): 24-32.
- Dhanapal R, Saraswathi T, Govind RN. Cancer cachexia. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2011; 15 (3): 257-260.
- DiMasi JA, Reichert JM, Feldman L, Malins A. Clinical approval success rates for investigational cancer drugs. *Clin Pharmacol Ther*. 2013; 94(3): 329-335.
- Dimitrijevic M, Stanojević S. The intriguing mission of neuropeptide Y in the immune system. *Amino Acids*. 2013; 45(1): 41-53.

- Dimmeler S, Haendeler J, Nehls M, Zeiher AM. Suppression of apoptosis by nitric oxide via inhibition of interleukin-1 β -converting enzyme (ICE)-like and cysteine protease protein (CPP)-32-like proteases. *J Exp Med*. 1997; 185(4): 601-607.
- Dobrolecki LE, Airhart SD, Alferez DG, et al. Patient-derived xenograft (PDX) models in basic and translational breast cancer research. *Cancer Metastasis Rev*. 2016; 35(4): 547-573.
- Dodson S, Baracos VE, Jatoi A, et al. Muscle wasting in cancer cachexia: clinical implications, diagnosis, and emerging treatment strategies. *Annu Rev Med*. 2011; 62: 265-279.
- Doherty JR, Cleveland JL. Targeting lactate metabolism for cancer therapeutics. *J Clin Invest*. 2013; 123(9): 3685-3692.
- Dolensek J, Rupnik MS, Stozer A. Structural similarities and differences between the human and the mouse pancreas. *Islets*. 2015; 7(1): e1024405.
- Drake RL, Vogl W, Mitchell AWM, Gray H. Gray's anatomy for students. Philadelphia: Elsevier/Churchill Livingstone. 2005.
- Drott C, Lundholm K. Glucose uptake and amino acid metabolism in perfused hearts from tumor-bearing rats. *J Surg Res*. 1990; 49(1): 62-68.
- Dwarkasing JT, Boekschoten MV, Argilès JM, et al. Differences in food intake of tumour-bearing cachectic mice are associated with hypothalamic serotonin signalling. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2015; 6(1): 84-94.
- Egerman MA, Glass DJ. Signaling pathways controlling skeletal muscle mass. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2014; 49(1): 59-68.
- Emanuel A, Krampitz J, Rosenberger F, Kind S, Rötzer I. Nutritional Interventions in Pancreatic Cancer: A Systematic Review. *Cancers (Basel)*. 2022; 14(9): 2212.
- Euhus DM, Hudd C, LaRegina MC, Johnson FE. Tumor measurement in the nude mouse. *J Surg Oncol*. 1986; 31(4): 229-34.
- Evans WJ, Morley JE, Argilès J, et al. Cachexia: a new definition. *Clin Nutr*. 2008; 27(6): 793-799.

- Falconer JS, Fearon KC, Plester CE, Ross JA, Carter DC. Cytokines, the acute-phase response, and resting energy expenditure in cachectic patients with pancreatic cancer. *Ann Surg*. 1994; 219(4): 325-331.
- Fang JJ, Zhu ZY, Dong H, Zheng GQ, Teng AG, Liu AJ. Effect of spleen lymphocytes on the splenomegaly in hepatocellular carcinoma-bearing mice. *Biomed Environ Sci*. 2014; 27(1): 17-26.
- Farrow KN, Lakshminrusimha S, Reda WJ, et al. Superoxide dismutase restores eNOS expression and function in resistance pulmonary arteries from neonatal lambs with persistent pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008; 295(6): L979-L987.
- Fearon K, Arends J, Baracos V. Understanding the mechanisms and treatment options in cancer cachexia. *Nat Rev Clin Oncol*. 2013; 10(2): 90-99.
- Fearon K, Strasser F, Anker SD, et al. Definition and classification of cancer cachexia: an international consensus. *Lancet Oncol*. 2011; 12(5): 489-495.
- Fearon KC, Glass DJ, Guttridge DC. Cancer cachexia: mediators, signaling, and metabolic pathways. *Cell Metab*. 2012; 16(2): 153-166.
- Fearon KC, Voss AC, Hustead DS; Cancer Cachexia Study Group. Definition of cancer cachexia: effect of weight loss, reduced food intake, and systemic inflammation on functional status and prognosis. *Am J Clin Nutr*. 2006; 83(6): 1345-1350.
- Fearon KC. Cancer cachexia: developing multimodal therapy for a multidimensional problem. *Eur J Cancer*. 2008; 44(8): 1124-1132.
- Felsenstein M, Hruban RH, Wood LD. New Developments in the Molecular Mechanisms of Pancreatic Tumorigenesis. *Adv Anat Pathol*. 2018; 25(2): 131-142.
- Fernando A, Glaysher S, Conroy M, Pekalski M, Smith J, Knight LA, Di Nicolantonio F, Cree IA. Effect of culture conditions on the chemosensitivity of ovarian cancer cell lines. *Anticancer Drugs*. 2006, 17: 913-919.
- Ferreira SH, Bartelt DC, Greene LJ. Isolation of bradykinin-potentiating peptides from *Bothrops jararaca* venom. *Biochemistry*. 1970;9(13):2583-2593.

Finnerty CC, Przkora R, Herndon DN, Jeschke MG. Cytokine expression profile over time in burned mice. *Cytokine*. 2009; 45(1): 20-25.

Flam BR, Eichler DC, Solomonson LP. Endothelial nitric oxide production is tightly coupled to the citrulline-NO cycle. *Nitric Oxide*. 2007;17(3-4):115-121.

Flanagan SP. 'Nude', a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse. *Genet Res*. 1966; 8(3): 295-309.

Forrester SJ, Kikuchi DS, Hernandez MS, Xu Q, Griendling KK. Reactive Oxygen Species in Metabolic and Inflammatory Signaling. *Circ Res*. 2018; 122(6): 877-902.

Fouladiun M, Körner U, Gunnebo L, Sixt-Ammilon P, Bosaeus I, Lundholm K. Daily physical-rest activities in relation to nutritional state, metabolism, and quality of life in cancer patients with progressive cachexia. *Clin Cancer Res*. 2007; 13(21): 6379-6385.

Frantz EDC, Prodel E, Braz ID, et al. Modulation of the renin-angiotensin system in white adipose tissue and skeletal muscle: focus on exercise training. *Clin Sci (Lond)*. 2018; 132(14): 1487-1507.

Gallagher D, Belmonte D, Deurenberg P, et al. Organ-tissue mass measurement allows modeling of REE and metabolically active tissue mass. *Am J Physiol*. 1998; 275(2): E249-E258.

Gelin J, Moldawer LL, Lönnroth C, Sherry B, Chizzonite R, Lundholm K. Role of endogenous tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 for experimental tumor growth and the development of cancer cachexia. *Cancer Res*. 1991; 51(1): 415-421.

Georgopapadakou NH, Liu FY, Ryono DE, Neubeck R, Ondetti MA. Chemical modifications of the active site of Streptomyces R61 DD-carboxypeptidase. *Eur J Biochem*. 1981;115(1):53-57.

Gerber MH, Underwood PW, Judge SM, et al. Local and Systemic Cytokine Profiling for Pancreatic Ductal Adenocarcinoma to Study Cancer Cachexia in an Era of Precision Medicine. *Int J Mol Sci*. 2018; 19(12): 3836.

Gibney E, Elia M, Jebb SA, Murgatroyd P, Jennings G. Total energy expenditure in patients with small-cell lung cancer: results of a validated study using the bicarbonate-urea method. *Metabolism*. 1997; 46(12): 1412-7.

Gilio JM, Portaro FC, Borella MI, Lameu C, Camargo AC, Alberto-Silva C. A bradykinin-potentiating peptide (Bj-PRO-10c) from *Bothrops jararaca* induces changes in seminiferous tubules. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*. 2013; 19(1): 28.

Giordano A, Calvani M, Petillo O, Carteni' M, Melone MR, Peluso G. Skeletal muscle metabolism in physiology and in cancer disease. *J Cell Biochem*. 2003; 90(1): 170-186.

Giovanella BC, Fogh J. The nude mouse in cancer research. *Adv Cancer Res*. 1985; 44: 69-120.

Gomes-Marcondes MC, Tisdale MJ. Induction of protein catabolism and the ubiquitin-proteasome pathway by mild oxidative stress. *Cancer Lett*. 2002; 180(1): 69-74.

Graul AI, Stringer M, Sorbera L. Cachexia. *Drugs Today (Barc)*. 2016; 52(9): 519-529.

Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*. 2010; 140(6): 883-899.

Grotmol KS, Lie HC, Hjermsstad MJ, Aass N, Currow D, Kaasa S, Moum TÅ, Pigni A, Loge JH; European Palliative Care Research Collaborative (EPCRC). Depression-A Major Contributor to Poor Quality of Life in Patients With Advanced Cancer. *J Pain Symptom Manage*. 2017; 54(6): 889-897.

Guerreiro JR, Lameu C, Oliveira EF, Klitzke CF, Melo RL, Linares E, Augusto O, Fox JW, Lebrun I, Serrano SM, Camargo AC. Argininosuccinate synthetase is a functional target for a snake venom anti-hypertensive peptide: role in arginine and nitric oxide production. *J Biol Chem*. 2009; 284(30): 20022-33.

Guimarães LMF, Rossini CVT, Lameu C. Implications of SARS-Cov-2 infection on eNOS and iNOS activity: Consequences for the respiratory and vascular systems. *Nitric Oxide*. 2021; 111-112: 64-71.

Gustafsson T, Osterlund T, Flanagan JN, et al. Effects of 3 days unloading on molecular regulators of muscle size in humans. *J Appl Physiol*. 2010; 109(3): 721-727.

Guttridge DC, Albanese C, Reuther JY, Pestell RG, Baldwin AS Jr. NF-kappaB controls cell growth and differentiation through transcriptional regulation of cyclin D1. *Mol Cell Biol*. 1999; 19(8): 5785-5799.

- Guzik TJ, Korbust R, Adamek-Guzik T. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J Physiol Pharmacol*. 2003; 54(4): 469-487.
- Hackeng WM, Hruban RH, Offerhaus GJ, Brosens LA. Surgical and molecular pathology of pancreatic neoplasms. *Diagn Pathol*. 2016; 11(1): 47.
- Haeberle L, Esposito I. Pathology of pancreatic cancer. *Transl Gastroenterol Hepatol*. 2019; 4:50.
- Han Y, Weinman S, Boldogh I, Walker RK, Brasier AR. Tumor necrosis factor- α -inducible I κ B α proteolysis mediated by cytosolic m-calpain. A mechanism parallel to the ubiquitin-proteasome pathway for nuclear factor- κ B activation. *J Biol Chem*. 1999; 274(2): 787-794.
- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000; 100(1): 57-70.
- Hartwig W, Hackert T, Hinz U, Gluth A, Bergmann F, Strobel O, Büchler MW, Werner J. Pancreatic cancer surgery in the new millennium: better prediction of outcome. *Ann Surg*. 2011; 254(2): 311-9.
- Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Müller-Newen G, Schaper F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J*. 2003; 374(Pt 1): 1-20.
- Henderson SE, Makhijani N, Mace TA. Pancreatic Cancer-Induced Cachexia and Relevant Mouse Models. *Pancreas*. 2018; 47(8): 937-945.
- Hendifar AE, Chang JI, Huang BZ, Tuli R, Wu BU. Cachexia, and not obesity, prior to pancreatic cancer diagnosis worsens survival and is negated by chemotherapy. *J Gastrointest Oncol*. 2018; 9(1): 17-23.
- Hidalgo M, Amant F, Biankin AV, et al. Patient-derived xenograft models: an emerging platform for translational cancer research. *Cancer Discov*. 2014; 4(9): 998-1013.
- Hinch EC, Sullivan-Gunn MJ, Vaughan VC, McGlynn MA, Lewandowski PA. Disruption of pro-oxidant and antioxidant systems with elevated expression of the ubiquitin proteasome system in the cachectic heart muscle of nude mice. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2013; 4(4): 287-293.

Hirsch D, Zukowska Z. NPY and stress 30 years later: the peripheral view. *Cell Mol Neurobiol.* 2012; 32(5): 645-59.

Hollander J, Fiebig R, Gore M, et al. Superoxide dismutase gene expression in skeletal muscle: fiber-specific adaptation to endurance training. *Am J Physiol.* 1999; 277(3): R856-R862.

Huang HY, Wu WR, Wang YH, et al. ASS1 as a novel tumor suppressor gene in myxofibrosarcomas: aberrant loss via epigenetic DNA methylation confers aggressive phenotypes, negative prognostic impact, and therapeutic relevance. *Clin Cancer Res.* 2013; 19(11): 2861-2872.

Ibarrola-Villava M, Cervantes A, Bardelli A. Preclinical models for precision oncology. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer.* 2018; 1870(2): 239-246.

Ilic M, Ilic I. Epidemiology of pancreatic cancer. *World J Gastroenterol.* 2016; 22(44): 9694-9705.

Illner K, Brinkmann G, Heller M, Bosy-Westphal A, Müller MJ. Metabolically active components of fat free mass and resting energy expenditure in nonobese adults. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2000; 278(2): E308-E315.

Inui A. Transgenic approach to the study of body weight regulation. *Pharmacol Rev.* 2000; 52(1): 35-61.

Ionescu-Tirgoviste C, Gagniuc PA, Gubceac E, et al. A 3D map of the islet routes throughout the healthy human pancreas. *Sci Rep.* 2015; 5: 14634.

Izumchenko E, Paz K, Ciznadija D, et al. Patient-derived xenografts effectively capture responses to oncology therapy in a heterogeneous cohort of patients with solid tumors. *Ann Oncol.* 2017; 28(10): 2595-2605.

Jackman RW, Kandarian SC. The molecular basis of skeletal muscle atrophy. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2004; 287(4): C834-43.

Janah L, Kjeldsen S, Galsgaard KD, et al. Glucagon Receptor Signaling and Glucagon Resistance. *Int J Mol Sci.* 2019; 20(13): 3314.

Jaworski K, Ahmadian M, Duncan RE, et al. AdPLA ablation increases lipolysis and prevents obesity induced by high-fat feeding or leptin deficiency. *Nat Med*. 2009; 15(2): 159-168.

Johns N, Hatakeyama S, Stephens NA, et al. Clinical classification of cancer cachexia: phenotypic correlates in human skeletal muscle. *PLoS One*. 2014; 9(1): e83618.

Joppa MA, Gogas KR, Foster AC, Markison S. Central infusion of the melanocortin receptor antagonist agouti-related peptide (AgRP(83-132)) prevents cachexia-related symptoms induced by radiation and colon-26 tumors in mice. *Peptides*. 2007; 28(3): 636-642.

Julienne CM, Dumas JF, Goupille C, et al. Cancer cachexia is associated with a decrease in skeletal muscle mitochondrial oxidative capacities without alteration of ATP production efficiency. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2012; 3(4): 265-275.

Jung J, Seol HS, Chang S. The Generation and Application of Patient-Derived Xenograft Model for Cancer Research. *Cancer Res Treat*. 2018; 50(1): 1-10.

Kaasa S, Loge JH, Fayers P, et al. Symptom assessment in palliative care: a need for international collaboration. *J Clin Oncol*. 2008; 26(23): 3867-3873.

Kaisanlahti A, Glumoff T. Browning of white fat: agents and implications for beige adipose tissue to type 2 diabetes. *J Physiol Biochem*. 2019; 75(1): 1-10.

Kalantar-Zadeh K, Rhee C, Sim JJ, Stenvinkel P, Anker SD, Kovesdy CP. Why cachexia kills: examining the causality of poor outcomes in wasting conditions. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2013; 4(2): 89-94.

Kamisawa T, Wood LD, Itoi T, Takaori K. Pancreatic cancer. *Lancet*. 2016; 388(10039): 73-85.

Kapur S, Bédard S, Marcotte B, Côté CH, Marette A. Expression of nitric oxide synthase in skeletal muscle: a novel role for nitric oxide as a modulator of insulin action. *Diabetes*. 1997; 46(11): 1691-1700.

Karakaş D, Ari F, Ulukaya E. The MTT viability assay yields strikingly false-positive viabilities although the cells are killed by some plant extracts. *Turk J Biol*. 2017; 41(6): 919-925.

- Kays JK, Shahda S, Stanley M, et al. Three cachexia phenotypes and the impact of fat-only loss on survival in FOLFIRINOX therapy for pancreatic cancer. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2018; 9(4): 673-684.
- Kazemi-Bajestani SM, Becher H, Fassbender K, Chu Q, Baracos VE. Concurrent evolution of cancer cachexia and heart failure: bilateral effects exist. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2014; 5(2): 95-104.
- Khal J, Wyke SM, Russell ST, Hine AV, Tisdale MJ. Expression of the ubiquitin-proteasome pathway and muscle loss in experimental cancer cachexia. *Br J Cancer*. 2005; 93(7): 774-780.
- Khaled WT, Liu P. Cancer mouse models: past, present and future. *Semin Cell Dev Biol*. 2014; 27: 54-60.
- Kim MP, Evans DB, Wang H, Abbruzzese JL, Fleming JB, Gallick GE. Generation of orthotopic and heterotopic human pancreatic cancer xenografts in immunodeficient mice. *Nat Protoc*. 2009; 4(11): 1670-1680.
- Kir S, White JP, Kleiner S, et al. Tumour-derived PTH-related protein triggers adipose tissue browning and cancer cachexia. *Nature*. 2014; 513(7516): 100-104.
- Klein S, Koretz RL. Nutrition support in patients with cancer: what do the data really show?. *Nutr Clin Pract*. 1994; 9(3): 91-100.
- Kluger BM, Krupp LB, Enoka RM. Fatigue and fatigability in neurologic illnesses: proposal for a unified taxonomy. *Neurology*. 2013; 80(4): 409-416.
- Koppenol WH, Bounds PL, Dang CV. Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. *Nat Rev Cancer*. 2011; 11(5): 325-37.
- Korhonen R, Lahti A, Kankaanranta H, Moilanen E. Nitric oxide production and signaling in inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 2005; 4(4): 471-479.
- Korsager Larsen M, Matchkov VV. Hypertension and physical exercise: The role of oxidative stress. *Medicina (Kaunas)*. 2016; 52(1): 19-27.
- Koutsounas I, Giaginis C, Patsouris E, Theocharis S. Current evidence for histone deacetylase inhibitors in pancreatic cancer. *World J Gastroenterol*. 2013; 19(6): 813-828.

Kowalczyk A, Wiecek A, Franek E, Kokot F. Steżenie leptyny, neuropeptydu Y oraz czynnika martwicy nowotworów alfa u chorych z nowotworami przed- i po radio- lub chemioterapii [Plasma concentration of leptin, neuropeptide Y and tumor necrosis factor alpha in patients with cancers, before and after radio- and chemotherapy]. *Pol Arch Med Wewn.* 2001; 106(2): 657-68.

Kurk SA, Peeters PHM, Dorresteijn B, et al. Impact of different palliative systemic treatments on skeletal muscle mass in metastatic colorectal cancer patients. *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* 2018; 9(5): 909-919.

Lameu C, Hayashi MA, Guerreiro JR, Oliveira EF, Lebrun I, Pontieri V, Morais KL, Camargo AC, Ulrich H. The central nervous system as target for antihypertensive actions of a proline-rich peptide from *Bothrops jararaca* venom. *Cytometry A.* 2010; 77(3): 220-30.

Lameu C, Pontieri V, Guerreiro JR, Oliveira EF, da Silva CA, Giglio JM, Melo RL, Campos RR, de Camargo AC, Ulrich H. Brain nitric oxide production by a proline-rich decapeptide from *Bothrops jararaca* venom improves baroreflex sensitivity of spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res.* 2010; 33(12): 1283-8.

Lameu C, Trujillo CA, Schwindt TT, Negraes PD, Pillat MM, Morais KL, Lebrun I, Ulrich H. Interactions between the NO-citrulline cycle and brain-derived neurotrophic factor in differentiation of neural stem cells. *J Biol Chem.* 2012; 287(35): 29690-701.

Landgren S, Simms JA, Thelle DS, et al. The ghrelin signalling system is involved in the consumption of sweets. *PLoS One.* 2011; 6(3): e18170.

Latenstein AEJ, Dijksterhuis WPM, Mackay TM, Beijer S, van Eijck CHJ, de Hingh IHJT, Molenaar IQ, van Oijen MGH, van Santvoort HC, de van der Schueren MAE, de Vos-Geelen J, de Vries JHM, Wilmink JW, Besselink MG, van Laarhoven HWM; Dutch Pancreatic Cancer Group. Cachexia, dietetic consultation, and survival in patients with pancreatic and periampullary cancer: A multicenter cohort study. *Cancer Med.* 2020; 9(24): 9385-9395.

Laviano A, Meguid MM, Preziosa I, Rossi Fanelli F. Oxidative stress and wasting in cancer. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2007; 10(4): 449-456.

- Lee NJ, Herzog H. NPY regulation of bone remodelling. *Neuropeptides*. 2009; 43(6): 457-63.
- Leitner LM, Wilson RJ, Yan Z, Gödecke A. Reactive Oxygen Species/Nitric Oxide Mediated Inter-Organ Communication in Skeletal Muscle Wasting Diseases. *Antioxid Redox Signal*. 2017; 26(13): 700-717.
- Li C, Heidt DG, Dalerba P, et al. Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res*. 2007; 67(3):1030-1037.
- Li Y, Di Santo JP. Modeling Infectious Diseases in Mice with a "Humanized" Immune System. *Microbiol Spectr*. 2019; 7(2): 10.1128/microbiolspec.BAI-0019-2019.
- Li YP, Atkins CM, Sweatt JD, Reid MB. Mitochondria mediate tumor necrosis factor- α /NF- κ B signaling in skeletal muscle myotubes. *Antioxid Redox Signal*. 1999; 1(1): 97-104.
- Li YP, Reid MB. NF- κ B mediates the protein loss induced by TNF- α in differentiated skeletal muscle myotubes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2000; 279(4): R1165-R1170.
- Lieffers JR, Mourtzakis M, Hall KD, McCargar LJ, Prado CM, Baracos VE. A viscerally driven cachexia syndrome in patients with advanced colorectal cancer: contributions of organ and tumor mass to whole-body energy demands. *Am J Clin Nutr*. 2009; 89(4): 1173-1179.
- Lin QJ, Yang F, Jin C, Fu DL. Current status and progress of pancreatic cancer in China. *World J Gastroenterol*. 2015; 21(26): 7988-8003.
- Lira VA, et al. Nitric oxide increases GLUT4 expression and regulates AMPK signaling in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2007; 293(4): E1062-8.
- Liu A, Yu X, Liu S. Pluripotency transcription factors and cancer stem cells: small genes make a big difference. *Chin J Cancer*. 2013; 32(9): 483-7.
- Liu K, Shen J, Cao Y, Cai C, Yao J. Duodenal infusions of isoleucine influence pancreatic exocrine function in dairy heifers. *Arch Anim Nutr*. 2018; 72(1): 31-41.
- Liu X, Shi D, Zhou S, Liu H, Liu H, Yao X. Molecular dynamics simulations and novel drug discovery. *Expert Opin Drug Discov*. 2018; 13(1): 23-37.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001; 25(4): 402-8.

Loberg RD, Bradley DA, Tomlins SA, Chinnaiyan AM, Pienta KJ. The lethal phenotype of cancer: the molecular basis of death due to malignancy. *CA Cancer J Clin*. 2007; 57(4): 225-241.

Lonovics J, Devitt P, Watson LC, Rayford PL, Thompson JC. Pancreatic polypeptide. A review. *Arch Surg*. 1981; 116(10): 1256-1264.

López-Lázaro M. Excessive superoxide anion generation plays a key role in carcinogenesis. *Int J Cancer*. 2007; 120(6): 1378-80.

Lundberg JO, Weitzberg E, Gladwin MT. The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*. 2008; 7(2): 156-67.

Macciò A, Madeddu C, Massa D, et al. Interleukin-6 and leptin as markers of energy metabolic changes in advanced ovarian cancer patients. *J Cell Mol Med*. 2009; 13(9B): 3951-3959.

Mager DE, Wyska E, Jusko WJ. Diversity of mechanism-based pharmacodynamic models. *Drug Metab Dispos*. 2003; 31(5): 510-8.

Malva JO, Xapelli S, Baptista S, Valero J, Agasse F, Ferreira R, Silva AP. Multifaces of neuropeptide Y in the brain--neuroprotection, neurogenesis and neuroinflammation. *Neuropeptides*. 2012; 46(6): 299-308.

Mantovani G, Macciò A, Lai P, Massa E, Ghiani M, Santona MC. Cytokine activity in cancer-related anorexia/cachexia: role of megestrol acetate and medroxyprogesterone acetate. *Semin Oncol*. 1998; 25(2 Suppl 6): 45-52.

Mantovani G, Macciò A, Madeddu C, et al. Antioxidant agents are effective in inducing lymphocyte progression through cell cycle in advanced cancer patients: assessment of the most important laboratory indexes of cachexia and oxidative stress. *J Mol Med (Berl)*. 2003; 81(10): 664-673.

Mantovani G, Madeddu C, Macciò A. Cachexia and oxidative stress in cancer: an innovative therapeutic management. *Curr Pharm Des*. 2012; 18(31): 4813-4818.

Mantovani G, Madeddu C. Cyclooxygenase-2 inhibitors and antioxidants in the treatment of cachexia. *Curr Opin Support Palliat Care*. 2008; 2(4): 275-281.

Marks DL, Butler AA, Turner R, Brookhart G, Cone RD. Differential role of melanocortin receptor subtypes in cachexia. *Endocrinology*. 2003; 144(4): 1513-1523.

Marks DL, Ling N, Cone RD. Role of the central melanocortin system in cachexia. *Cancer Res*. 2001; 61(4): 1432-1438.

Matsubara K, Higaki T, Matsubara Y, Nawa A. Nitric oxide and reactive oxygen species in the pathogenesis of preeclampsia. *Int J Mol Sci*. 2015; 16(3): 4600-4614.

Matthys P, Dijkmans R, Proost P, et al. Severe cachexia in mice inoculated with interferon-gamma-producing tumor cells. *Int J Cancer*. 1991; 49(1): 77-82.

McAllister SS, Weinberg RA. The tumour-induced systemic environment as a critical regulator of cancer progression and metastasis. *Nat Cell Biol*. 2014; 16(8): 717-727.

Mei J, Banneke S, Lips J, Kuffner MTC, Hoffmann CJ, Dirnagl U, Endres M, Harms C, Emmrich JV. Refining humane endpoints in mouse models of disease by systematic review and machine learning-based endpoint definition. *ALTEX*. 2019; 36(4): 555-571.

Melo AGC, Coradazzi AL, et al. Consenso Brasileiro de Caquexia/Anorexia em cuidados paliativos. *Revista Brasileira de Cuidados Paliativos*. 2011; 3(3): 1-42.

Mesa RA, Nagorney DS, Schwager S, Allred J, Tefferi A. Palliative goals, patient selection, and perioperative platelet management: outcomes and lessons from 3 decades of splenectomy for myelofibrosis with myeloid metaplasia at the Mayo Clinic. *Cancer*. 2006; 107(2): 361-370.

Michaelis KA, Zhu X, Burfeind KG, et al. Establishment and characterization of a novel murine model of pancreatic cancer cachexia. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2017; 8(5): 824-838.

Miller A, McLeod L, Alhayyani S, et al. Blockade of the IL-6 trans-signalling/STAT3 axis suppresses cachexia in Kras-induced lung adenocarcinoma. *Oncogene*. 2017; 36(21): 3059-3066.

Moiola CP, Lopez-Gil C, Cabrera S, et al. Patient-Derived Xenograft Models for Endometrial Cancer Research. *Int J Mol Sci*. 2018; 19(8): 2431.

Montero-Fernández N, Serra-Rexach JA. Role of exercise on sarcopenia in the elderly. *Eur J Phys Rehabil Med.* 2013; 49(1): 131-143.

Moraes, L.B.C.A. Desenvolvimento de xenotransplantes de tumores pancreáticos humanos para varredura genética de alvos moleculares com potencial terapêutico. 2018. 123 p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Morton CL, Houghton PJ. Establishment of human tumor xenografts in immunodeficient mice. *Nat Protoc.* 2007; 2(2): 247-50.

Moses AG, Maingay J, Sangster K, Fearon KC, Ross JA. Pro-inflammatory cytokine release by peripheral blood mononuclear cells from patients with advanced pancreatic cancer: relationship to acute phase response and survival. *Oncol Rep.* 2009; 21(4): 1091-1095.

Moses AW, Slater C, Preston T, Barber MD, Fearon KC. Reduced total energy expenditure and physical activity in cachectic patients with pancreatic cancer can be modulated by an energy and protein dense oral supplement enriched with n-3 fatty acids. *Br J Cancer.* 2004; 90(5): 996-1002.

Mueller TC, Burmeister MA, Bachmann J, Martignoni ME. Cachexia and pancreatic cancer: are there treatment options?. *World J Gastroenterol.* 2014; 20(28): 9361-9373.

Murphy KT, Chee A, Gleeson BG, et al. Antibody-directed myostatin inhibition enhances muscle mass and function in tumor-bearing mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2011; 301(3): R716-R726.

Murphy KT, Lynch GS. Update on emerging drugs for cancer cachexia. *Expert Opin Emerg Drugs.* 2009; 14(4): 619-632.

Murtaugh LC, Keefe MD. Regeneration and repair of the exocrine pancreas. *Annu Rev Physiol.* 2015; 77: 229-249.

Mustafa I, Leverve X. Metabolic and nutritional disorders in cardiac cachexia. *Nutrition.* 2001; 17(9): 756-760.

Nagasaka M, Gadgeel SM. Role of chemotherapy and targeted therapy in early-stage non-small cell lung cancer. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2018;18(1):63-70.

Nakayama H, Nishida K, Otsu K. Macromolecular Degradation Systems and Cardiovascular Aging. *Circ Res*. 2016; 118(10): 1577-1592.

Nara-ashizawa N, Tsukada T, Maruyama K, Akiyama Y, Kajimura N, Nagasaki K, Iwanaga T, Yamaguchi K. Hypothalamic appetite-regulating neuropeptide mRNA levels in cachectic nude mice bearing human tumor cells. *Metabolism*. 2001; 50(10): 1213-9.

Narsale AA, Enos RT, Puppa MJ, et al. Liver inflammation and metabolic signaling in ApcMin/+ mice: the role of cachexia progression. *PLoS One*. 2015; 10(3): e0119888.

Nedergaard J, Ricquier D, Kozak LP. Uncoupling proteins: current status and therapeutic prospects. *EMBO Rep*. 2005; 6(10): 917-921.

Nehls M, Pfeifer D, Schorpp M, Hedrich H, Boehm T. New member of the winged-helix protein family disrupted in mouse and rat nude mutations. *Nature*. 1994; 372(6501): 103-107.

Nicholson LJ, Smith PR, Hiller L, et al. Epigenetic silencing of argininosuccinate synthetase confers resistance to platinum-induced cell death but collateral sensitivity to arginine auxotrophy in ovarian cancer. *Int J Cancer*. 2009; 125(6): 1454-1463.

Nilsson IA, Lindfors C, Schalling M, Hökfelt T, Johansen JE. Anorexia and hypothalamic degeneration. *Vitam Horm*. 2013; 92: 27-60.

Oberstein PE, Olive KP. Pancreatic cancer: why is it so hard to treat?. *Therap Adv Gastroenterol*. 2013; 6(4): 321-337.

Okada S, Vaeteewoottacharn K, Kariya R. Application of Highly Immunocompromised Mice for the Establishment of Patient-Derived Xenograft (PDX) Models. *Cells*. 2019; 8(8): 889.

Okada S, Vaeteewoottacharn K, Kariya R. Establishment of a Patient-Derived Tumor Xenograft Model and Application for Precision Cancer Medicine. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2018; 66(3): 225-230.

Oliveira EF, Guerreiro JR, Silva CA, Benedetti GFS. Enhancement of the citrulline-nitric oxide cycle in astrogloma cells by the proline-rich peptide-10c from Bothrops jararaca venom. *Brain research*. 2010; 1363: 11-9.

Ondetti MA, Cushman DW. Angiotensin-converting enzyme inhibitors: biochemical properties and biological actions. *CRC Crit Rev Biochem*. 1984;16(4):381-411.

Paludan SR. Synergistic action of pro-inflammatory agents: cellular and molecular aspects. *J Leukoc Biol*. 2000; 67(1): 18-25.

Patel CN, Kumar SP, Rawal RM, Patel DP, Gonzalez FJ, Pandya HA. A multiparametric organ toxicity predictor for drug discovery. *Toxicol Mech Methods*. 2020; 30(3): 159-166.

Patel HJ, Patel BM. TNF- α and cancer cachexia: Molecular insights and clinical implications. *Life Sci*. 2017; 170: 56-63.

Patra SK, Arora S. Integrative role of neuropeptides and cytokines in cancer anorexia-cachexia syndrome. *Clin Chim Acta*. 2012; 413(13-14): 1025-34.

Paulson AS, Tran Cao HS, Tempero MA, Lowy AM. Therapeutic advances in pancreatic cancer. *Gastroenterology*. 2013; 144(6): 1316-1326.

Payen VL, Porporato PE, Baselet B, Sonveaux P. Metabolic changes associated with tumor metastasis, part 1: tumor pH, glycolysis and the pentose phosphate pathway. *Cell Mol Life Sci*. 2016; 73(7): 1333-1348.

PDQ Adult Treatment Editorial Board. Pancreatic Cancer Treatment (Adult) (PDQ®): Patient Version (2020).

Peeters AC, Netea MG, Kullberg BJ, Thien T, van der Meer JW. The effect of renin-angiotensin system inhibitors on pro- and anti-inflammatory cytokine production. *Immunology*. 1998; 94(3): 376-379.

Penet MF, Bhujwala ZM. Cancer cachexia, recent advances, and future directions. *Cancer J*. 2015; 21(2): 117-122.

Peng HB, Libby P, Liao JK. Induction and stabilization of I kappa B alpha by nitric oxide mediates inhibition of NF-kappa B. *J Biol Chem*. 1995; 270(23): 14214-9.

Petersen MC, Shulman GI. Mechanisms of Insulin Action and Insulin Resistance. *Physiol Rev*. 2018; 98(4): 2133-2223.

Petruzzelli M, Schweiger M, Schreiber R, Campos-Olivas R, Tsoli M, Allen J, Swarbrick M, Rose-John S, Rincon M, Robertson G, Zechner R, Wagner EF. A switch from white

to brown fat increases energy expenditure in cancer-associated cachexia. *Cell Metab.* 2014; 20(3): 433-47.

Pettersen K, Andersen S, Degen S, et al. Cancer cachexia associates with a systemic autophagy-inducing activity mimicked by cancer cell-derived IL-6 trans-signaling. *Sci Rep.* 2017; 7(1): 2046.

Piegari M, Ortiz S, Díaz Mdel P, Eynard AR, Valentich MA. Characterization of a murine lung adenocarcinoma (LAC1), a useful experimental model to study progression of lung cancer. *J Exp Ther Oncol.* 2011; 9(3): 231-239.

Pin F, Barreto R, Kitase Y, et al. Growth of ovarian cancer xenografts causes loss of muscle and bone mass: a new model for the study of cancer cachexia. *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* 2018; 9(4): 685-700.

Pizon M, Schott D, Pachmann U, Pachmann K. The number of tumorspheres cultured from peripheral blood is a predictor for presence of metastasis in patients with breast cancer. *Oncotarget.* 2016; 7(30): 48143-48154.

Pollak MN, Schernhammer ES, Hankinson SE. Insulin-like growth factors and neoplasia. *Nat Rev Cancer.* 2004; 4(7): 505-518.

Ponti D, Costa A, Zaffaroni N, Pratesi G, Petrangolini G, Coradini D, Pilotti S, Pierotti MA, Daidone MG. Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer Res.* 2005; 65(13): 5506-11.

Porporato PE. Understanding cachexia as a cancer metabolism syndrome. *Oncogenesis.* 2016; 5(2): e200.

Poulika KA, Sarantis P, Antoniadou D, Koustas E, Papadimitropoulou A, Papavassiliou AG, Karamouzis MV. Pancreatic Cancer and Cachexia-Metabolic Mechanisms and Novel Insights. *Nutrients.* 2020; 12(6): 1543.

Powell JR, Cook J, Wang Y, Peck R, Weiner D. Drug Dosing Recommendations for All Patients: A Roadmap for Change. *Clin Pharmacol Ther.* 2021; 109(1): 65-72.

Powers SK, Jackson MJ. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol Rev.* 2008; 88(4): 1243-1276.

Prado CM, Baracos VE, McCargar LJ, et al. Body composition as an independent determinant of 5-fluorouracil-based chemotherapy toxicity. *Clin Cancer Res.* 2007; 13(11): 3264-3268.

Prado CM, Sawyer MB, Ghosh S, et al. Central tenet of cancer cachexia therapy: do patients with advanced cancer have exploitable anabolic potential?. *Am J Clin Nutr.* 2013; 98(4): 1012-1019.

Qualliotine-Mann D, Agwu DE, Ellenburg MD, McCall CE, McPhail LC. Phosphatidic acid and diacylglycerol synergize in a cell-free system for activation of NADPH oxidase from human neutrophils. *J Biol Chem.* 1993; 268(32): 23843-23849.

Querobino SM, Ribeiro CAJ, Alberto-Silva C. Bradykinin-potentiating PEPTIDE-10C, an argininosuccinate synthetase activator, protects against H₂O₂-induced oxidative stress in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Peptides.* 2018; 103: 90-97.

Radloff DR, Rinella ES, Threadgill DW. Modeling cancer patient populations in mice: Complex genetic and environmental factors. *Drug Discov Today Dis Models.* 2008; 4(2): 83-88.

Rajendran P, Nandakumar N, Rengarajan T, et al. Antioxidants and human diseases. *Clin Chim Acta.* 2014; 436: 332-347.

Ramos EJ, Suzuki S, Marks D, Inui A, Asakawa A, Meguid MM. Cancer anorexia-cachexia syndrome: cytokines and neuropeptides. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2004; 7(4): 427-434.

Ronga I, Gallucci F, Riccardi F, Uomo G. Anorexia-cachexia syndrome in pancreatic cancer: recent advances and new pharmacological approach. *Adv Med Sci.* 2014; 59(1): 1-6.

Rorsman P, Huising MO. The somatostatin-secreting pancreatic δ -cell in health and disease. *Nat Rev Endocrinol.* 2018; 14(7): 404-414.

Ross PJ, Ashley S, Norton A, et al. Do patients with weight loss have a worse outcome when undergoing chemotherapy for lung cancers?. *Br J Cancer.* 2004; 90(10): 1905-1911.

Rottenberg S, Pajic M, Jonkers J. Studying drug resistance using genetically engineered mouse models for breast cancer. *Methods Mol Biol.* 2010; 596: 33-45.

Rubio-Viqueira B, Hidalgo M. Direct in vivo xenograft tumor model for predicting chemotherapeutic drug response in cancer patients. *Clin Pharmacol Ther.* 2009; 85(2): 217-221.

Rubio-Viqueira B, Jimeno A, Cusatis G, et al. An in vivo platform for translational drug development in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res.* 2006; 12(15): 4652-4661.

Rudrappa SS, Wilkinson DJ, Greenhaff PL, Smith K, Idris I, Atherton PJ. Human Skeletal Muscle Disuse Atrophy: Effects on Muscle Protein Synthesis, Breakdown, and Insulin Resistance-A Qualitative Review. *Front Physiol.* 2016; 7: 361.

Rydén M, Agustsson T, Laurencikiene J, et al. Lipolysis--not inflammation, cell death, or lipogenesis--is involved in adipose tissue loss in cancer cachexia. *Cancer.* 2008; 113(7): 1695-1704.

Saif MW, Galanina N, Ravage-Mass L, Kaley K, Cornfeld D, Lamb L, Chhieng D. Bone Metastasis as the Only Metastatic Site in a Patient with Pancreatic Cancer following Distal Pancreatectomy. *Case Rep Med.* 2010; 2010: 634975.

Saisho Y. Pancreas Volume and Fat Deposition in Diabetes and Normal Physiology: Consideration of the Interplay Between Endocrine and Exocrine Pancreas. *Rev Diabet Stud.* 2016; 13(2-3): 132-147.

Sajdyk TJ, Shekhar A, Gehlert DR. Interactions between NPY and CRF in the amygdala to regulate emotionality. *Neuropeptides.* 2004; 38(4): 225-34.

Sanders PM, Russell ST, Tisdale MJ. Angiotensin II directly induces muscle protein catabolism through the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway and may play a role in cancer cachexia. *Br J Cancer.* 2005; 93(4): 425-434.

Sanzo M, Colucci R, Arunachalam M, Berti S, Moretti S. Stress as a possible mechanism in melanoma progression. *Dermatol Res Pract.* 2010; 2010: 483493.

Schgoer W, Theurl M, Jeschke J, et al. Gene therapy with the angiogenic cytokine secretoneurin induces therapeutic angiogenesis by a nitric oxide-dependent mechanism. *Circ Res.* 2009; 105(10): 994-1002.

Schorpp M, Hofmann M, Dear TN, Boehm T. Characterization of mouse and human nude genes. *Immunogenetics.* 1997;46(6):509-515.

Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol.* 2004; 75(2): 163-189.

Schuermeier I, Maican A, Sharp R, Bena J, Triozzi PL, Singh AD. Depression, Anxiety, and Regret Before and After Testing to Estimate Uveal Melanoma Prognosis. *JAMA Ophthalmol.* 2016; 134(1): 51-6.

Schulz E, Wenzel P, Münzel T, Daiber A. Mitochondrial redox signaling: Interaction of mitochondrial reactive oxygen species with other sources of oxidative stress. *Antioxid Redox Signal.* 2014; 20(2): 308-324.

Seibenhener ML, Wooten MC. Use of the Open Field Maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice. *J Vis Exp.* 2015; (96): e52434.

Sharma SV, Haber DA, Settleman J. Cell line-based platforms to evaluate the therapeutic efficacy of candidate anticancer agents. *Nat Rev Cancer.* 2010; 10(4): 241-253.

Shende P, Desai D. Physiological and Therapeutic Roles of Neuropeptide Y on Biological Functions. *Adv Exp Med Biol.* 2020; 1237: 37-47.

Sies H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biol.* 2015; 4: 180-183.

Silva CA, Portaro F, Fernandes BL, Ianzer D. Tissue distribution in mice of BPP 10c, a potent proline-rich anti-hypertensive peptide of *Bothrops jararaca*. *Toxicon.* 2008; 51(4): 515-23

Siolas D, Hannon GJ. Patient-derived tumor xenografts: transforming clinical samples into mouse models. *Cancer Res.* 2013; 73(17): 5315-5319.

Skipworth RJ, Stewart GD, Dejong CH, Preston T, Fearon KC. Pathophysiology of cancer cachexia: much more than host-tumour interaction?. *Clin Nutr.* 2007; 26(6): 667-676.

Skulachev VP. Role of uncoupled and non-coupled oxidations in maintenance of safely low levels of oxygen and its one-electron reductants. *Q Rev Biophys.* 1996; 29(2): 169-202.

Smith HJ, Tisdale MJ. Signal transduction pathways involved in proteolysis-inducing factor induced proteasome expression in murine myotubes. *Br J Cancer*. 2003; 89(9): 1783-1788.

Soneja A, et al. Role of nitric oxide, nitroxidative and oxidative stress in wound healing. *Pharmacol Rep*. 2005; 57: 108-119.

Song MK, Park BB, Uhm JE. Understanding Splenomegaly in Myelofibrosis: Association with Molecular Pathogenesis. *Int J Mol Sci*. 2018; 19(3): 898.

Song YH, Li Y, Du J, Mitch WE, Rosenthal N, Delafontaine P. Muscle-specific expression of IGF-1 blocks angiotensin II-induced skeletal muscle wasting. *J Clin Invest*. 2005; 115(2): 451-458.

Stakleff KDS, Von Gruenigen VE. Rodent models for ovarian cancer research. *Int J Gynecol Cancer*. 2003; 13: 405-412.

Stathis A, Moore MJ. Advanced pancreatic carcinoma: current treatment and future challenges. *Nat Rev Clin Oncol*. 2010; 7(3): 163-172.

Steckelings UM, Kaschina E, Unger T. The AT2 receptor--a matter of love and hate. *Peptides*. 2005; 26(8): 1401-1409.

Stewart EL, Mascaux C, Pham NA, et al. Clinical Utility of Patient-Derived Xenografts to Determine Biomarkers of Prognosis and Map Resistance Pathways in EGFR-Mutant Lung Adenocarcinoma. *J Clin Oncol*. 2015; 33(22): 2472-2480.

Stofkova A, Haluzik M, Zelezna B, Kiss A, Skurlova M, Lacinova Z, Jurcovicova J. Enhanced expressions of mRNA for neuropeptide Y and interleukin 1 beta in hypothalamic arcuate nuclei during adjuvant arthritis-induced anorexia in Lewis rats. *Neuroimmunomodulation*. 2009; 16(6): 377-84.

Strassmann G, Fong M, Kenney JS, Jacob CO. Evidence for the involvement of interleukin 6 in experimental cancer cachexia. *J Clin Invest*. 1992; 89(5): 1681-1684.

Stuehr DJ, Haque MM. Nitric oxide synthase enzymology in the 20 years after the Nobel Prize. *Br J Pharmacol*. 2019; 176(2): 177-188.

Suggitt M, Bibby MC. 50 years of preclinical anticancer drug screening: empirical to target-driven approaches. *Clin Cancer Res*. 2005; 11(3): 971-981.

- Sullivan-Gunn MJ, Campbell-O'Sullivan SP, Tisdale MJ, Lewandowski PA. Decreased NADPH oxidase expression and antioxidant activity in cachectic skeletal muscle. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2011; 2(3): 181-188.
- Sun H, Sudip T, Fu X, Wen S, Liu H, Yu S. Cachexia is associated with depression, anxiety and quality of life in cancer patients. *BMJ Support Palliat Care*. 2020: bmjspcare-2019-002176.
- Sun L, et al. Thymic epithelial cell development and its dysfunction in human diseases. *Biomed Res Int*. 2014; 2014: 206929.
- Sun X, Feng X, Wu X, Lu Y, Chen K, Ye Y. Fat Wasting Is Damaging: Role of Adipose Tissue in Cancer-Associated Cachexia. *Front Cell Dev Biol*. 2020; 8:33.
- Takimoto E, Kass DA. Role of oxidative stress in cardiac hypertrophy and remodeling. *Hypertension*. 2007; 49(2): 241-248.
- Talbert EE, Metzger GA, He WA, Guttridge DC. Modeling human cancer cachexia in colon 26 tumor-bearing adult mice. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2014; 5(4): 321-328.
- Tan BH, Fearon KC. Cytokine gene polymorphisms and susceptibility to cachexia. *Curr Opin Support Palliat Care*. 2010; 4(4): 243-248.
- Taniyama Y, Griendling KK. Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. *Hypertension*. 2003; 42(6): 1075-1081.
- ten Kate M, van der Wal JB, Sluiter W, Hofland LJ, Jeekel J, Sonneveld P, van Eijck CH. The role of superoxide anions in the development of distant tumour recurrence. *Br J Cancer*. 2006; 95(11): 1497-503.
- Tentler JJ, Tan AC, Weekes CD, et al. Patient-derived tumour xenografts as models for oncology drug development. *Nat Rev Clin Oncol*. 2012; 9(6): 338-350.
- Tessitore L, Bonelli G, Baccino FM. Early development of protein metabolic perturbations in the liver and skeletal muscle of tumour-bearing rats. A model system for cancer cachexia. *Biochem J*. 1987; 241(1): 153-159.
- Thibaudeau TA, Smith DM. A Practical Review of Proteasome Pharmacology. *Pharmacol Rev*. 2019; 71(2): 170-197.

- Tisdale MJ. Mechanisms of cancer cachexia. *Physiol Rev.* 2009; 89(2): 381-410.
- Toledo, J.C. et al. Connecting the Chemical and Biological Properties of Nitric Oxide. *Chem Res Toxicol.* 2012; 25: 975–989.
- Tomayko MM, Reynolds CP. Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1989; 24(3): 148-54.
- Torres MP, Rachagani S, Soucek JJ, Mallya K, Johansson SL, Batra SK. Novel pancreatic cancer cell lines derived from genetically engineered mouse models of spontaneous pancreatic adenocarcinoma: applications in diagnosis and therapy. *PLoS One.* 2013; 8(11): e80580.
- Tousoulis D, Kampoli AM, Tentolouris C, Papageorgiou N, Stefanadis C. The role of nitric oxide on endothelial function. *Curr Vasc Pharmacol.* 2012; 10(1): 4-18.
- Tsoli M, Moore M, Burg D, et al. Activation of thermogenesis in brown adipose tissue and dysregulated lipid metabolism associated with cancer cachexia in mice. *Cancer Res.* 2012; 72(17): 4372-4382.
- Tsoli M, Swarbrick MM, Robertson GR. Lipolytic and thermogenic depletion of adipose tissue in cancer cachexia. *Semin Cell Dev Biol.* 2016; 54: 68-81.
- Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol.* 2003; 552(Pt 2): 335-344.
- Van Cutsem E, van de Velde H, Karasek P, et al. Phase III trial of gemcitabine plus tipifarnib compared with gemcitabine plus placebo in advanced pancreatic cancer. *J Clin Oncol.* 2004; 22(8): 1430-1438.
- van der Vliet A, Eiserich JP, Shigenaga MK, Cross CE. Reactive nitrogen species and tyrosine nitration in the respiratory tract: epiphenomena or a pathobiologic mechanism of disease?. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999; 160(1): 1-9.
- van Putten M, de Winter C, van Roon-Mom W, van Ommen GJ, 't Hoen PA, Aartsma-Rus A. A 3 months mild functional test regime does not affect disease parameters in young mdx mice. *Neuromuscul Disord.* 2010; 20(4): 273-80.
- van Weerden WM, Romijn JC. Use of nude mouse xenograft models in prostate cancer research. *Prostate.* 2000; 43(4): 263-271.

Vanhoutte G, van de Wiel M, Wouters K, et al. Cachexia in cancer: what is in the definition? *BMJ Open Gastroenterol.* 2016; 3(1): e000097.

Von Hoff DD, Ervin T, Arena FP, et al. Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine. *N Engl J Med.* 2013; 369(18): 1691-1703.

Vos TJ, Caracoti A, Che JL, et al. Identification of 2-[2-[2-(5-bromo-2-methoxyphenyl)-ethyl]-3-fluorophenyl]-4,5-dihydro-1H-imidazole (ML00253764), a small molecule melanocortin 4 receptor antagonist that effectively reduces tumor-induced weight loss in a mouse model. *J Med Chem.* 2004; 47(7): 1602-1604.

Vreeland TJ, Katz MHG. Timing of Pancreatic Resection and Patient Outcomes: Is There a Difference? *Surg Clin North Am.* 2018; 98(1): 57-71.

Wang F, Li SS, Segersvärd R, et al. Hypoxia inducible factor-1 mediates effects of insulin on pancreatic cancer cells and disturbs host energy homeostasis. *Am J Pathol.* 2007; 170(2): 469-477.

Wang F, Liu H, Hu L, et al. The Warburg effect in human pancreatic cancer cells triggers cachexia in athymic mice carrying the cancer cells. *BMC Cancer.* 2018; 18(1): 360.

Wang H, Cheng H, Wang F, Wei D, Wang X. An improved 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) reduction assay for evaluating the viability of *Escherichia coli* cells. *J Microbiol Methods.* 2010; 82(3): 330-3.

Wang T, Zhang X, Li JJ. The role of NF-kappaB in the regulation of cell stress responses. *Int Immunopharmacol.* 2002; 2(11): 1509-1520.

Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science.* 1956; 123(3191): 309-314.

Waterhouse C, Keilson J. Cori cycle activity in man. *J Clin Invest.* 1969; 48(12): 2359-2366.

Wei Y, Sowers JR, Clark SE, Li W, Ferrario CM, Stump CS. Angiotensin II-induced skeletal muscle insulin resistance mediated by NF-kappaB activation via NADPH oxidase. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2008; 294(2): E345-51.

Weijl NI, Cleton FJ, Osanto S. Free radicals and antioxidants in chemotherapy-induced toxicity. *Cancer Treat Rev.* 1997; 23(4): 209-240.

- Westerterp, K. Control of energy expenditure in humans. *Eur J Clin Nutr.* 2017; 71: 340–344.
- Westphal M, Enkhbaatar P, Schmalstieg FC, et al. Neuronal nitric oxide synthase inhibition attenuates cardiopulmonary dysfunctions after combined burn and smoke inhalation injury in sheep. *Crit Care Med.* 2008; 36(4): 1196-1204.
- Whittle JR, Lewis MT, Lindeman GJ, Visvader JE. Patient-derived xenograft models of breast cancer and their predictive power. *Breast Cancer Res.* 2015; 17(1): 17.
- Wigmore SJ, Plester CE, Richardson RA, Fearon KC. Changes in nutritional status associated with unresectable pancreatic cancer. *Br J Cancer.* 1997; 75(1): 106-109.
- Wigmore SJ, Plester CE, Ross JA, Fearon KC. Contribution of anorexia and hypermetabolism to weight loss in anicteric patients with pancreatic cancer. *Br J Surg.* 1997; 84(2): 196-197.
- Willis MS, Bevilacqua A, Pulinilkunnit T, Kienesberger P, Tannu M, Patterson C. The role of ubiquitin ligases in cardiac disease. *J Mol Cell Cardiol.* 2014; 71: 43-53.
- Wilson RB, Solass W, Archid R, Weinreich FJ, Königsrainer A, Reymond MA. Resistance to anoikis in transcoelomic shedding: the role of glycolytic enzymes. *Pleura Peritoneum.* 2019; 4(1): 20190003.
- Winter A, MacAdams J, Chevalier S. Normal protein anabolic response to hyperaminoacidemia in insulin-resistant patients with lung cancer cachexia. *Clin Nutr.* 2012; 31(5): 765-773.
- Wolfgang CL, Herman JM, Laheru DA, et al. Recent progress in pancreatic cancer. *CA Cancer J Clin.* 2013; 63(5): 318-348.
- Wurdak H, Zhu S, Romero A, et al. An RNAi screen identifies TRRAP as a regulator of brain tumor-initiating cell differentiation. *Cell Stem Cell.* 2010; 6(1): 37-47.
- Wyke SM, Tisdale MJ. NF-kappaB mediates proteolysis-inducing factor induced protein degradation and expression of the ubiquitin-proteasome system in skeletal muscle. *Br J Cancer.* 2005; 92(4): 711-721.
- Xia Y, Zweier JL. Superoxide and peroxynitrite generation from inducible nitric oxide synthase in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997; 94(13): 6954-8.

Yamamoto R, Akazawa H, Fujihara H, et al. Angiotensin II type 1 receptor signaling regulates feeding behavior through anorexigenic corticotropin-releasing hormone in hypothalamus. *J Biol Chem*. 2011; 286(24): 21458-21465.

Yang M, Kim J, Kim JS, et al. Hippocampal dysfunctions in tumor-bearing mice. *Brain Behav Immun*. 2014; 36: 147-155.

Yoshida T, Delafontaine P. Mechanisms of Cachexia in Chronic Disease States. *Am J Med Sci*. 2015; 350(4): 250-256.

Yoshida T, Tabony AM, Galvez S, et al. Molecular mechanisms and signaling pathways of angiotensin II-induced muscle wasting: potential therapeutic targets for cardiac cachexia. *Int J Biochem Cell Biol*. 2013; 45(10): 2322-2332.

Yu Z, Li P, Zhang M, Hannink M, Stamler JS, Yan Z. Fiber type-specific nitric oxide protects oxidative myofibers against cachectic stimuli. *PLoS One*. 2008; 3(5): e2086.

Zhang D, Zhou Y, Wu L, et al. Association of IL-6 gene polymorphisms with cachexia susceptibility and survival time of patients with pancreatic cancer. *Ann Clin Lab Sci*. 2008; 38(2): 113-119.

Zhang L, Du J, Hu Z, Han G, Delafontaine P, Garcia G, Mitch WE. IL-6 and serum amyloid A synergy mediates angiotensin II-induced muscle wasting. *J Am Soc Nephrol*. 2009; 20(3): 604-12.

Zhang WL, Li N, Shen Q, Fan M, Guo XD, Zhang XW, Zhang Z, Liu X. Establishment of a mouse model of cancer cachexia with spleen deficiency syndrome and the effects of atractylenolide I. *Acta Pharmacol Sin*. 2020; 41(2): 237-248.

Zhang X, Claerhout S, Prat A, et al. A renewable tissue resource of phenotypically stable, biologically and ethnically diverse, patient-derived human breast cancer xenograft models. *Cancer Res*. 2013; 73(15): 4885-4897.

Zhao W, Swanson SA, Ye J, et al. Reactive oxygen species impair sympathetic vasoregulation in skeletal muscle in angiotensin II-dependent hypertension. *Hypertension*. 2006; 48(4): 637-643.

Zhou J, et al. The effect of 131I-induced hypothyroidism on the levels of nitric oxide (NO), interleukin 6 (IL-6), tumor necrosis factor alpha (TNF- α), total nitric oxide

synthase (NOS) activity, and expression of NOS isoforms in rats. *Bosn J Basic Med Sci.* 2018; 18(4): 305-312.

Zhou T, Wang B, Liu H, et al. Development and validation of a clinically applicable score to classify cachexia stages in advanced cancer patients. *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* 2018; 9(2): 306-314.

Zhou W, Jiang ZW, Tian J, Jiang J, Li N, Li JS. Role of NF-kappaB and cytokine in experimental cancer cachexia. *World J Gastroenterol.* 2003; 9(7): 1567-1570.

Zimmers TA, Fishel ML, Bonetto A. STAT3 in the systemic inflammation of cancer cachexia. *Semin Cell Dev Biol.* 2016; 54: 28-41.

Zimmers TA, McKillop IH, Pierce RH, Yoo JY, Koniaris LG. Massive liver growth in mice induced by systemic interleukin 6 administration. *Hepatology.* 2003; 38(2): 326-334.

Zuijdgeest-van Leeuwen SD, van den Berg JW, Wattimena JL, et al. Lipolysis and lipid oxidation in weight-losing cancer patients and healthy subjects. *Metabolism.* 2000; 49(7): 931-936.

8. ATIVIDADES COMPLEMENTARES

8.1. Participação em Eventos

- Congresso Acadêmico (UNIFESP) - Universidade em Defesa da Vida. 2021.
- 28º SIICUSP - Simpósio Internacional de Iniciação Científica e Tecnológica da Universidade de São Paulo (USP). 2020.
- Ciclo de Seminários Virtuais: Iniciativas relacionadas a pandemia de SARS-Cov2 (UFRJ). 2020.
- Congresso Acadêmico (UNIFESP) - Ciência e Universidade: Transformações para a Sociedade. 2020.
- I Congresso Brasileiro de Ciências Biológicas On-line (CONBRACIB). 2020.
- I Simpósio de Câncer de São Paulo (USP). 2020.
- 27º SIICUSP - Simpósio Internacional de Iniciação Científica e Tecnológica da Universidade de São Paulo (USP). 2019.

8.2. Resumos Publicados em Anais de Congressos

- **Rossini CVT**, Reis EMR, Lameu, C. Modelo animal de caquexia induzida por xenotransplante de adenocarcinoma pancreático humano. I Simpósio de Câncer de São Paulo, 2020, São Paulo / SP.
- Silveiras PHS, **Rossini CVT**, Ribeiro AVFN, Loiola AO, Ribeiro JN. Avaliação do pó da raiz de alcaçuz (*Glycyrrhiza glabra* L.) como um novo adsorvente na remoção de corantes têxteis em meio aquoso. I Congresso Brasileiro de Ciências Biológicas On-line (On-line), 2020, Fortaleza / CE.

8.3. Artigos Publicados

- Coutinho F, Guimarães LM, Seeger R, Paula J Santos A, Glaser T, Yamamoto D, Lacerda L, Arnaud-Sampaio V, **Rossini CVT**, Rabelo I, Miranda de Medeiros N, Ramos Truzzi D, Aparecida Juliano M, Juliano L, Ulrich H, Lameu C. Bj-PRO-10c, as an allosteric regulator of argininosuccinate synthase, is a potential therapy for neuroblastoma metastasis. *Toxicon*. 2023; 233: 107228.
- Moreira RB, Fernandes M, Monteiro MR, Luiz FMA, Silva ES, Andrade PM, Pinto MB, Lima L, Silva A, Nunez J, Freitas D, Araujo LHL, **Rossini CVT**, Aguiar PN. Body mass index and immune checkpoint inhibitor efficacy in metastatic cancer patients: a Brazilian retrospective study. *Frontiers in Urology*. 2022; 2: 1069045.
- Guimarães LMF, **Rossini CVT**, Lameu C. Implications of SARS-Cov-2 infection on eNOS and iNOS activity: Consequences for the respiratory and vascular systems. *Nitric Oxide*. 2021; 111-112: 64-71.

8.4. Artigos em produção

- **Rossini CVT**, Guimarães LMF, Bento CA, Alves-de-Moraes LBC, Jukemura J, Machado MCC, Reis EM, Lameu C. Animal models of xenograft-induced cachexia of patient-derived pancreatic câncer.

8.5. Formação Complementar

- Biochemical Principles of Energy Metabolism (On-line). 2020. Korea Advanced Institute of Science and Technology, Coréia do Sul.
- Understanding Cancer Metastasis (On-line). 2020. Johns Hopkins University, Estados Unidos.
- Science of Exercise (On-line). 2020. University of Colorado Boulder, Estados Unidos.

- Fundamentals of Immunology: Innate Immunity and B-Cell Function (On-line). 2020. Rice University, Estados Unidos.
- COVID-19 Contact Tracing (On-line). 2020. Johns Hopkins University, Estados Unidos.

8.6. Outros

- XVI Curso de Verão em Bioquímica e Biologia Molecular (USP). Monitor. 2021.
- 28º SIICUSP - Simpósio Internacional de Iniciação Científica e Tecnológica da Universidade de São Paulo (USP). Avaliador de trabalhos apresentados na área de Bioquímica. 2020.
- 27º SIICUSP - Simpósio Internacional de Iniciação Científica e Tecnológica da Universidade de São Paulo (USP). Avaliador de trabalhos apresentados na área de Bioquímica. 2019.

9. APÊNDICE A – Certificado CEPesq (Hospital Sírio-Libanês)

HOSPITAL SÍRIO LIBANÊS /
SOCIEDADE BENEFICENTE DE
SENHORAS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Busca de novos alvos terapêuticos no câncer de pâncreas

Pesquisador: Eduardo Moraes Rego Reis

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 36005314.1.0000.5461

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE DE SAO PAULO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio
FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SAO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 834.279

Data da Relatoria: 09/10/2014

Apresentação do Projeto:

O adenocarcinoma ductal do pâncreas (PDAC, pancreatic ductal adenocarcinoma), o tipo mais prevalente de câncer pancreático, é uma neoplasia extremamente agressiva e em geral letal. A ausência de opções terapêuticas eficientes motiva a busca de vulnerabilidades moleculares nestes tumores que possam ser exploradas no desenvolvimento de novas terapias para o PDAC. Neste trabalho, vamos rastrear genes essenciais para a

sobrevivência do PDAC empregando uma estratégia de silenciamento gênico com short hairpin RNAs (shRNAs), uma classe de RNA de interferência (RNAi). Células tumorais obtidas de pacientes com PDAC serão expandidas in vivo por meio de xenotransplantes em camundongos severamente imunodeficientes. Culturas primárias derivadas desses xenotransplantes serão utilizadas para o rastreamento de vulnerabilidades genéticas utilizando bibliotecas de shRNAs que alvejam centenas de genes simultaneamente. Inicialmente, serão testados shRNAs que alvejam 243 genes envolvidos na regulação da cromatina. Com essa abordagem esperamos identificar proteínas participantes da maquinaria epigenética cujo silenciamento afete significativamente a sobrevivência do PDAC, expondo assim potenciais candidatos a alvos farmacológicos para o tratamento da doença.

Endereço: Rua Peixoto Gomide, 316 - 7º andar

Bairro: Jardim Paulista

UF: SP


Município: SAO PAULO

CEP: 01.409-000

Telefone: (11)3394-5701

E-mail: cepesq@hsl.org.br

**HOSPITAL SÍRIO LIBANÊS /
SOCIEDADE BENEFICENTE DE
SENHORAS**



Continuação do Parecer: 834.279

Projeto envolvendo o uso de participantes com câncer de pâncreas que serão submetidos a cirurgia. Após obtenção de TCLE, o tumor extraído será transportado para o biotério do IQ/USP e enxertados em roedores. O pesquisador possui apoio financeiro da FAPESP e o HSL será a instituição co-participante.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar se o silenciamento do conjunto conhecido de genes codificadores de proteínas com função de "escrita", "leitura" ou "limpeza" de marcas epigenéticas em células derivadas de tumores de pâncreas poderá revelar genes essenciais para a sobrevivência do tumor.

Esta informação será relevante para o desenvolvimento de novas terapias para a doença, por exemplo através da identificação de fármacos que interfiram com a função destas proteínas.

Objetivo Primário:

Identificar alvos terapêuticos no PDAC através do rastreamento por RNA de interferência em xenotransplantes de tumores utilizando bibliotecas de short hairpin RNAs.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O pesquisador considera o risco mínimo para o participante, embora todos os estudos tenham um risco, ainda que considerado como risco mínimo associado a qualquer estudo.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa possui relevância científica e poderá gerar dados que auxiliem, no futuro, novas pesquisas para o desenvolvimento de produtos destinados ao tratamento de pacientes com cancer.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Documentação apresentada conforme legislação vigente e normas da instituição.

Recomendações:

não se aplica

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Protocolo cadastrado no CEPesq como HSL 2014-68 aprovado em 09-10-2014 conforme as versões listadas abaixo:

- Projeto de Pesquisa versão 1 - 20-05-2014

- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido versão 1 de 1 de novembro de 2013.

Lembramos que o pesquisador deverá manter o CEPesq informado sobre o andamento de sua pesquisa através do envio de relatórios parciais (semestrais) e final. De acordo com o cronograma

Endereço: Rua Peixoto Gomide, 316 - 7º andar

Bairro: Jardim Paulista

UF: SP

Telefone: (11)3394-5701

Município: SAO PAULO

CEP: 01.409-000

E-mail: cepesq@hsl.org.br

HOSPITAL SÍRIO LIBANÊS /
SOCIEDADE BENEFICENTE DE
SENHORAS



Continuação do Parecer: 834.279

apresentado, o primeiro relatório parcial está previsto para ser entregue em 09-04-2015. Caso haja alterações no protocolo, cronograma do estudo, ou em qualquer outro documento do estudo por favor, submeter atualização.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

SAO PAULO, 16 de Outubro de 2014

Assinado por:
Bernardo Garicochea
(Coordenador)

Endereço: Rua Peixoto Gomide, 316 - 7º andar

Bairro: Jardim Paulista

UF: SP

Município: SAO PAULO

CEP: 01.409-000

Telefone: (11)3394-5701

E-mail: cepsq@hsl.org.br

10. APÊNDICE B – Certificado CEUA (IQ-USP)



CERTIFICADO Nº 132/2019

Certifico que o Projeto “Estudo de potenciais fármacos para prevenção e tratamento da metástase e caquexia induzida por câncer de pâncreas” desenvolvido sob responsabilidade do(a) Prof(a). Dr(a). Claudiana Lameu, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA), do IQ-USP, em 08/08/2019.

We attest that the project entitled “Estudo de potenciais fármacos para prevenção e tratamento da metástase e caquexia induzida por câncer de pâncreas”, developed under the responsibility of Dr(a). Claudiana Lameu, follows the regulations established by the National Council for Control of Animal Experimentation and has been approved by the Internal Animal Care and Use Committee of the Institute of Chemistry, University of São Paulo, on 08/08/2019.

São Paulo, 17 de Novembro de 2020.



Profa. Dra. Daniela Sanchez Bassères
Presidente CEUA

11. APÊNDICE C – Laudo Anatomopatológico do paciente 08



**HOSPITAL
SÍRIO-LIBANÊS**

Nome:
Data de nascimento:
N. Atendimento: 6069068

Idade:
Sexo: F
Data: 03/11/2015

EXAME ANATOMOPATOLÓGICO

Material ID: AP15-029488

Topografia: Pâncreas e Baço

MACROSCOPIA - Pancreatectomia corpo-caudal e esplenectomia:

Fixador: Formol tamponado a 10%

Recebido espécime cirúrgico em monobloco constituído por pancreatectomia parcial (segmento de corpo e cauda de Pâncreas) e Baço.

O segmento pancreático mede 13,7 x 4,1 x 2,0 cm, com superfície externa lobulada, com discretas áreas de tecido adiposo aderido. A face anterior foi tingida de marrom, a posterior de preto e a margem pancreática de azul. O baço mede 10,5 x 7,5 x 3,0 cm, com superfície externa acinzentada e rugosa, exibindo tecido adiposo peri-esplênico. Aos cortes, nota-se na porção de colo/corpo pancreático, lesão mal delimitada medindo 4,5 x 3,0 x 2,5 cm, constituída por tecido pardo-claro e firme. A lesão dista 0,6 cm da margem pancreática, 0,2 cm da parede posterior e 0,2 cm da anterior. No restante o parênquima pancreático é acastanhado, lobulado, ora firme, ora elástico, sendo observada na porção caudal dilatação intensa do ducto pancreático principal, medindo 0,7 x 0,6 cm nas maiores dimensões. O parênquima esplênico é castanho-avermelhado e macio, sem particularidades. Os vasos do hilo esplênico encontram-se preservados.

Do tecido adiposo peri-pancreático anterior, foram dissecados treze (13) linfonodos acastanhados e elásticos, que medem entre 0,2 cm e 0,8 cm.

Do tecido adiposo peri-pancreático posterior, foram dissecados seis (06) linfonodos acastanhados e elásticos, que medem entre 0,2 cm e 1,2 cm.

Do tecido adiposo periesplênico, foram dissecados quinze (15) linfonodos acastanhados e elásticos, que medem entre 0,2 cm e 0,7 cm.

Apenso ao pâncreas e o baço, observa-se tecido adiposo amarelado com áreas vinhosas, que mede 15,5 x 12,3 x 1,5 cm, onde não foram observados nódulos ou áreas de implante tumoral.

Toda lesão foi representada, sendo dividida em quinze fatias, sequencialmente representadas do colo para cauda do pâncreas.

No restante fragmentos representativos foram submetidos a exame histológico, conforme designações:

1-A - Margem pancreática (congelada); 1-B - Lesão (congelada); 1-C - Fatia 1; 1-D - Fatia 2; 1-E - Fatia 3; 1-F - Fatia 4A; 1-G - Fatia 4B; 1-H - Fatia 5; 1-I - Fatia 6; 1-J - Fatia 7A; 1-K - Fatia 7B; 1-L - Fatia 8A; 1-M - Fatia 8B; 1-N - Fatia 9; 1-O - Fatia 10; 1-P - Fatia 11; 1-Q - Fatia 12; 1-R - Fatia 13; 1-S - Fatia 14; 1-T - Fatia 15; 1-U - Estrutura cística; 1-V - Outras áreas (pâncreas); 1-W - Outras áreas (pâncreas); 1-X - Outras áreas (pâncreas); 1-Y - Vasos do hilo esplênico; 1-Z - Outras áreas (baço); 1-AA - Outras áreas (baço); 1-AB - Três nódulos (anterior); 1-AC - Um nódulo (anterior); 1-AD - Um nódulo (anterior); 1-AE - Um nódulo (anterior); 1-AF - Um nódulo (anterior); 1-AG - Um nódulo (anterior); 1-AH - Um nódulo (anterior); 1-AI - Um nódulo (anterior); 1-AJ - Um nódulo (anterior); 1-AK - Um nódulo (anterior); 1-AL - Um nódulo (anterior); 1-AM - Um nódulo (anterior); 1-AN - Cinco nódulos (periesplênicos); 1-AO - Cinco nódulos (periesplênicos); 1-AP - Um nódulo (periesplênicos); 1-AQ - Um nódulo (periesplênicos); 1-AR - Um nódulo (periesplênicos); 1-AS ao 1-AV - Tecido adiposo (apenso ao pâncreas e baço)

DIAGNÓSTICO: - Produto de Pancreatectomia corpo-caudal e esplenectomia:

- Adenocarcinoma ductal invasivo com as seguintes características:

- Topografia da lesão: corpo/cauda de Pâncreas.
- Tamanho da lesão: 4,5 x 3,0 x 2,5 cm.
- Tipo histológico (OMS, 2010): adenocarcinoma ductal.

Emitido em: 04/11/2015

Patologista Responsável: CRM 91285 DRA LUCIANA RODRIGUES MEIRELLES



**HOSPITAL
SÍRIO-LIBANÊS**

Nome:

Data de nascimento:

N. Atendimento: 6069068

Idade:

Data: 03/11/2015

Sexo: F

- Grau histológico 2 (moderadamente diferenciado), com área focais de padrão pouco diferenciado.
- Extensão tumoral: a neoplasia infiltra o tecido adiposo peripancreático -**pT3**.
- Invasão carcinomatosa perineural e intraneural presentes.
- Invasão carcinomatosa angiolinfática presente.
- Invasão mural de ramos vascular arterial intraparenquimatoso presente.
- Necrose tumoral presente (em cerca de 15% da área tumoral total amostrada).
- Limites anterior e posterior do parênquima pancreático coincidentes com a neoplasia.
- Margem de ressecção cirúrgica pancreática livre (dista microscopicamente 0,3 cm da neoplasia).
- Metástase para um (01) de um total de seis (06) linfonodos peri-pancreáticos posteriores dissecados (01/06).
- Treze (13) linfonodos peri-pancreáticos anteriores dissecados livres de neoplasia (00/13).
- Quinze (15) linfonodos periesplênicos dissecados livres de neoplasia (00/15).
- Sumário dos linfonodos dissecados: metástase para um (01) de um total de trinta e quatro (34) linfonodos regionais dissecados (01/34) - **pN1**.

- Achados morfológicos adicionais:

- Dilatação ductal pós-obstrutiva envolvendo ducto pancreático principal e ductos secundários.
- Pancreatite crônica com extensas áreas de atrofia acinar, fibrose parenquimatosa e focos de neoplasia intraepitelial pancreática de alto grau (Pan-IN 3). Atividade inflamatória focal (exsudato fibrinoleucocitário na luz de ductos dilatados).
- Hiperplasia fibrocongestiva leve da polpa vermelha esplênica.

- Achados morfológicos adicionais:

- Dilatação ductal pós-obstrutiva envolvendo ducto pancreático principal e ductos secundários.
- Pancreatite crônica com extensas áreas de atrofia acinar, fibrose parenquimatosa e focos de neoplasia intraepitelial pancreática de alto grau (Pan-IN 3). Atividade inflamatória focal (exsudato fibrinoleucocitário na luz de ductos dilatados).
- Hiperplasia fibrocongestiva leve da polpa vermelha esplênica.

NOTAS:

1- Estadiamento patológico (TNM sétima edição / AJCC / UICC): pT3 pN1, estadio mínimo IIB.

2- Protocolo de exame macro e microscópico de espécimes com neoplasia em pâncreas exócrino proposto pelo CAP (Colégio Americano de Patologistas, 2013).

Emitido em: 04/11/2015

Patologista Responsável: CRM 91285 DRA LUCIANA RODRIGUES MEIRELLES

12. APÊNDICE D – Laudo Anatomopatológico do paciente 12



CICAP - CENTRO DE IMUNO-HISTOQUÍMICA, CITOPATOLOGIA E ANATOMIA PATOLÓGICA

Prof. Dr. Venâncio A. F. Alves - CRM 34.238
 Dra. Yara de Menezes - CRM 45.279
 Dr. Celso di Loreto - CRM 39.831
 Dra. Juliana Naves Ravanini - CRM 125.307
 Dra. Livia Barreira Cavalcante - CRM 151.990

Dra. Maria Regina Vianna - CRM 45.383
 Dr. Evandro Sobroza de Mello - CRM 95.539
 Dr. Ryan Yuki Matsui Tanigawa - CRM 131.446
 Dra. Paula Martinez Vianna - CRM 151.948
 Dra. Rafaela Brito Bezerra Pinheiro - CRM 158.666
 Dra. Marcela Arruda P. S. Vasconcelos - CRM 143.913

Rua João Julião, 331 - Paraíso - CEP 01323-020 - São Paulo - SP - Fone/Fax: 3288-2421 / 3549-0971 / 3549-0972

* AP16 - 004748 *

Nome do paciente:

Sexo: M Dt. Nasc.:

Médico(s) solicitante(s): PROF. DR. JOSE JUKEMURA

Instituição: HAOC - CENTRO CIRÚRGICO

Convênio: SUL AMÉRICA

Número Exame: AP16-004748

Nº Same: 120026865

Recebido: 27/02/2016

Emitido: 03/03/2016 11:42

1186582

* 1186582 *

LAUDO ANATOMOPATOLÓGICO

DADOS CLÍNICOS

Tumor de pâncreas. Colelitíase. Ver laudo intra- operatório: IO16-000207.

PEÇA(S):

- 1 - PÂNCREAS - SEGMENTO CORPO/CAUDAL
- 2 - LINFONODOS PERIPANCREÁTICOS
- 3 - BAÇO
- 4 - LINFONODOS PERIESPLÊNICOS
- 5 - LINFONODO DE ARTÉRIA HEPÁTICA
- 6 - VESÍCULA BILIAR

EXAME MACROSCÓPICO

O espécime, previamente fixado em formaldeído 4% tamponado com fosfato básico de sódio pH7.2-7.4, consta de:

- 1- Segmento corpo/caudal de pâncreas em monobloco com o baço e gordura peripancreática, submetido a exame intra- operatório de congelção, medindo 8,0x4,5x2,5cm. A superfície externa foi identificada com tinta nanquim sendo a anterior em azul e a posterior em preta. Aos cortes, observa-se lesão nodular esbranquiçada de limites imprecisos, envolvendo o ducto pancreático medindo 4,0x2,5x2,4cm, distando 4,0cm da margem pancreática e estendendo-se para o tecido adiposo peripancreático. O restante do parênquima pancreático apresenta perda da lobulação e indefinição dos limites com a gordura, de consistência firme e coloração esbranquiçada.
- 2- No tecido adiposo peripancreático foram dissecadas 12 estruturas nodulares, medindo de 0,1 a 0,6cm.
- 3- Baço pesando 295,0 gramas e medindo 16,5x10,0x3,5cm, recoberto por cápsula acinzentada e rugosa. Aos cortes observa-se parênquima castanho-vinhoso, com textura habitual.
- 4- No tecido adiposo peri-esplênico foram dissecadas 8 estruturas nodulares, medindo de 0,2 a 1,0cm.
- 5- Identifica-se estrutura nodular, acastanhada e elástica, medindo 2,0x1,3x1,3cm no maior eixo.
- 6- Vesícula biliar, recebida fechada, medindo 5,7cm de comprimento, apresentando perimetro de 3,5cm no fundo e 0,5cm no colo. Apresenta serosa lisa e brilhante, com mucosa granulosa, castanho-esverdeada. A parede tem estratificação preservada, com espessura máxima de 0,4cm.

* Fragmentos representativos são submetidos a exame histológico assim designado:

- 1 PÂNCREAS - SEGMENTO CORPO CAUDAL
 - 1-A - congelção lesão e linfonodo peripancreático (1ft) 1-A-1 - H-E
 - 1-B - congelção margem (1ft) 1-B-1 - H-E
 - 1-C - lesão (1ft) 1-C-1 - H-E
 - 1-D - (2ft) 1-D-1 - H-E / 1-E - (1ft) 1-E-1 - H-E / 1-F - (2ft) 1-F-1 - H-E / 1-G - (1ft) 1-G-1 - H-E / 1-H - (1ft) 1-H-1 - H-E / 1-I - (1ft) 1-I-1 - H-E / 1-J - (1ft) 1-J-1 - H-E / 1-K - (2ft) 1-K-1 - H-E
- 2 LINFONODOS PERIPANCREÁTICOS
 - 2-A - (12ft) 2-A-1 - H-E
 - 2-B - remanescente (3ft) 2-B-1 - H-E
- 3 BAÇO
 - 3-A - (2ft) 3-A-1 - H-E / 3-B - (2ft) 3-B-1 - H-E
- 4 LINFONODOS PERI-ESPLÊNICOS
 - 4-A - (8ft) 4-A-1 - H-E
 - 4-B - remanescente (2ft) 4-B-1 - H-E
- 5 LINFONODO DE ARTÉRIA HEPÁTICA
 - 5-A - (3ft) 5-A-1 - H-E / 5-B - (3ft) 5-B-1 - H-E
- 6 VESÍCULA BILIAR
 - 6-A - (4ft) 6-A-1 - H-E

Médico(s) patologista(s) responsáveis:

Laudo lido/validado por:

Dra. Paula Martinez Vianna - CRM 151.948

Dra. Maria Regina Vianna - CRM. 45.383

Dra. Maria Regina Vianna - CRM. 45.383



CICAP - CENTRO DE IMUNO-HISTOQUÍMICA, CITOPATOLOGIA E ANATOMIA PATOLÓGICA

Prof. Dr. Venâncio A. F. Alves - CRM 34.238
 Dra. Yara de Menezes - CRM 45.279
 Dr. Celso di Loreto - CRM 39.831
 Dra. Juliana Naves Ravanini - CRM 125.307
 Dra. Livia Barreira Cavalcante - CRM 151.990

Dra. Maria Regina Vianna - CRM 45.383
 Dr. Evandro Sobroza de Mello - CRM 95.539
 Dr. Ryan Yukimatsu Tamigawa - CRM 131.446
 Dra. Paula Martinez Vianna - CRM 151.948
 Dra. Rafaela Brito Bezerra Pinheiro - CRM 158.666
 Dra. Marcela Arruda P. S. Vasconcelos - CRM 143.913

Rua João Julião, 331 - Paraíso - CEP 01323-020 - São Paulo - SP - Fone/Fax: 3288-2421 / 3549-0971 / 3549-0972

* AP16 - 004748 *

Nome do paciente:

Sexo: M Dt. Nasc.:

Médico(s) solicitante(s): PROF. DR. JOSE JUKEMURA

Instituição: HAOC - CENTRO CIRÚRGICO

Convênio: SUL AMÉRICA

Número Exame: AP16-004748

Nº Same: 120026865

Recebido: 27/02/2016

Emitido: 03/03/2016 11:42

1186582

* 1186582 *

EXAME MICROSCÓPICO

O exame histológico revela:

- 1- Cortes da lesão de pâncreas exibindo neoplasia de padrão ductal pouco diferenciada, com áreas de células claras, notando-se ainda células isoladas ou formando pequenos agrupamentos. Há infiltração neoplásica vascular linfática e perineural, com intensa desmoplasia e extensão para a gordura peripancreática, com moderado infiltrado inflamatório linfocitário formando folículos linfoides. Não se identifica permeação vascular sanguínea pela neoplasia. As margens de ressecção pancreática e circunferencial estão livres de neoplasia. O parênquima adjacente à neoplasia tem focos de atrofia. Presença ainda de ductos ectásicos com epitélio proliferado, por vezes formando projeções papiliformes, com focos de displasia de baixo grau.
- 2- Cinco dos linfonodos peripancreáticos, que incluem os 12 dissecados e 6 imersos na gordura peripancreática, identificados à microscopia, estão acometidos pela neoplasia.
- 3- Cortes de baço com arquitetura geral preservada, notando-se fibrose dos seios medulares associada a intensa ectasia sinusoidal. São vistas numerosas hemácias falcizadas nos espaços sinusoidais. Presença de proliferação vascular de padrão cavernoso em região subcapsular.
- 4- Linfonodos preservados livres de neoplasia.
- 5- Linfonodo com arquitetura preservada, livre de neoplasia.
- 6- Cortes de vesícula biliar apresentando graus variados de hiperplasia mucosa e fibrose transmural. São vistos alguns seios de Rokitansky e Aschoff e infiltrado linfo-histiocitário discreto multifocal. Presença ainda de focos com agregados de histiócitos xantomatosos em posição subepitelial.

CONCLUSÃO

- 1- ADENOCARCINOMA DUCTAL POUCO DIFERENCIADO DE SEGMENTO CORPO/CAUDAL DE PÂNCREAS MEDINDO 4,0 CM NO MAIOR EIXO, INFILTRANDO GORDURA PERIPANCREÁTICA. PRESENÇA DE INFILTRAÇÃO NEOPLÁSICA VASCULAR LINFÁTICA E PERINEURAL. INFILTRAÇÃO NEOPLÁSICA VASCULAR SANGÜÍNEA NÃO IDENTIFICADA. MARGENS DE RESSEÇÃO CIRÚRGICA PROXIMAL E CIRCUNFERENCIAL LIVRES DE NEOPLASIA. NEOPLASIA INTRADUCTAL PANCREÁTICA DE BAIXO GRAU (PanIN 1) E PANCREATITE CRÔNICA OBSTRUTIVA ADJACENTES. ESTADIAMENTO ANATOMOPATOLÓGICO: pT3 pN1.

2- METÁSTASE PARA 5 DE 18 LINFONODOS PERIPANCREÁTICOS.

3- BAÇO ESCLEROCONGESTIVO COM HEMANGIOMA SUBCAPSULAR MICROSCÓPICO.

4- LINFONODOS PERI-ESPLÊNICOS LIVRES DE NEOPLASIA (0/8).

5- LINFONODO DE ARTÉRIA HEPÁTICA LIVRE DE NEOPLASIA (0/1).

Laudo lido/validado por:

Dra. Paula Martinez Vianna - CRM 151.948

Dra. Maria Regina Vianna - CRM. 45.383

Médico(s) patologista(s) responsáveis:

Dra. Maria Regina Vianna - CRM. 45.383

PATHOX - Teelimgaga s.l.



CICAP - CENTRO DE IMUNO-HISTOQUÍMICA, CITOPATOLOGIA E ANATOMIA PATOLÓGICA

Prof. Dr. Venâncio A. F. Alves - CRM 34.238
 Dra. Yara de Menezes - CRM 45.279
 Dr. Celso di Loreto - CRM 39.831
 Dra. Juliana Naves Ravanini - CRM 125.307
 Dra. Livia Barreira Cavalcante - CRM 151.990

Dra. Maria Regina Vianna - CRM 45.383
 Dr. Evandro Sobroza de Mello - CRM 95.539
 Dr. Ryan Yukimatsu Tanigawa - CRM 131.446
 Dra. Paula Martinez Vianna - CRM 151.948
 Dra. Rafaela Brito Bezerra Pinheiro - CRM 158.666
 Dra. Marcela Arruda P. S. Vasconcelos - CRM 143.913

Rua João Julião, 331 - Paraíso - CEP 01323-020 - São Paulo - SP - Fone/Fax: 3288-2421 / 3549-0971 / 3549-0972

* AP16 - 004748 *

Nome do paciente:

Sexo: M Dt. Nasc.:

Médico(s) solicitante(s): PROF. DR. JOSE JUKEMURA

Instituição: HAOC - CENTRO CIRÚRGICO

Convênio: SUL AMÉRICA

Número Exame: AP16-004748

Nº Same: 120026865

Recebido: 27/02/2016

Emitido: 03/03/2016 11:42

1186582

* 1186582 *

6- COLECISTITE CRÔNICA COM COLESTEROLOSE.


CHECKLIST DE CARCINOMA DE PÂNCREAS	
Espécime	Produto de pancreatectomia parcial, corpo-caudal
Localização do tumor	Corpo pancreático
Tamanho do tumor	4,0x2,5x2,4 cm
Tipo histológico	Adenocarcinoma ductal
Grau histológico	G3, pouco diferenciado
Extensão microscópica tumor	Tumor invade os tecidos moles peripancreáticos
Margens (proximal e circunferencial)	Livres de neoplasia (0,2cm da margem mais próxima)
Invasão vascular linfática	Presente, focal
Invasão vascular sanguínea	Não identificada
Invasão perineural	Presente, extensa
Sumário dos linfonodos	Metástases em 5 de 27 linfonodos examinados
Estadiamento (pTNM)	pT3 pN1
Outros achados	PanIN 1

Médico(s) patologista(s) responsáveis:

Laudo lido/validado por:

Dra. Paula Martinez Vianna - CRM 151.948

Dra. Maria Regina Vianna - CRM. 45.383


 Dra. Maria Regina Vianna - CRM. 45.383