

UNIVERSIDADE DE RIBEIRÃO PRETO-UNAERP  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA APLICADA A  
SAÚDE

TESE DE DOUTORADO

**“Aspectos celulares, moleculares, nutricionais e epidemiológicos da  
caquexia associada ao câncer”**

Me. GABRIELA GONZALEZ SEGURA

Orientadora: Profa Dra Ana Lucia Fachin

RIBEIRÃO PRETO

Novembro

2023

**“Aspectos celulares, moleculares, nutricionais e epidemiológicos da caquexia associada ao câncer”**

Doutoranda: Gabriela Gonzalez Segura

Defesa de tese apresentada ao programa de pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia aplicada à saúde.  
Orientador: Profa. Dra. Ana Lucia Fachin Saltoratto

RIBEIRÃO PRETO

2023

Ficha catalográfica preparada pelo Centro de Processamento  
Técnico da Biblioteca Central da UNAERP

- Universidade de Ribeirão Preto -

SEGURA, Gabriela Gonzalez, 1995-

S456a Aspectos celulares, moleculares, nutricionais e epidemiológicos da  
caquexia associada ao câncer / Gabriela Gonzalez Segura. – Ribeirão  
Preto, 2024.

98 f.

Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Lúcia Fachin Saltoratto.

Tese (Doutorado) - Universidade de Ribeirão Preto, UNAERP,  
Doutorado em Biotecnologia, 2024.

**GABRIELA GONZALEZ SEGURA**

**ASPECTOS CELULARES, MOLECULARES, NUTRICIONAIS E  
EPIDEMIOLÓGICOS DA CAQUEXIA ASSOCIADA AO CÂNCER**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Ribeirão Preto, para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Área de Concentração: Doutorado em Biotecnologia

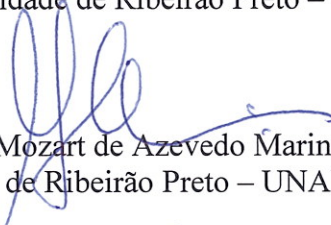
Data da defesa: 27 de novembro de 2023

Resultado: Aprovada

**BANCA EXAMINADORA**



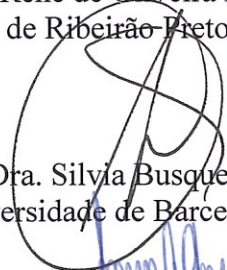
Prof. Dra. Ana Lucia Fachin Saltoratto  
Presidente/Universidade de Ribeirão Preto – UNAERP



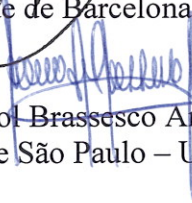
Prof. Dr. Mozart de Azevedo Marins  
Universidade de Ribeirão Preto – UNAERP



Prof. Dr. Rene de Oliveira Beleboni  
Universidade de Ribeirão Preto – UNAERP



Prof. Dra. Sílvia Busquets Rius  
Universidade de Barcelona



Prof. Dra. Maria Sol Brassesco Annichini  
Universidade de São Paulo – USP

**RIBEIRÃO PRETO  
2023**

**Dedico,**

Este trabalho a minha família, e  
especialmente aos meus avôs.

## AGRADECIMENTOS

- Primeiramente gostaria de agradecer a Deus, por me dar suporte quando pensei que iria desistir. Ele me socorreu, segurou a minha mão e me deu a capacidade de lidar com situações mais difíceis.
- Minha família, principalmente meus avós (Norival e Maria das Graças). Sem o incentivo de vocês eu não teria formação e independência. Aos meus pais (Alexandre e Nivea) que me deram todo o suporte para o meu processo de evolução e aos meus irmãos (Lucas Gabriel e Giulia) que foram os impulsionadores e motivadores para que eu evoluísse no trabalho.
- Agradeço a Profa. Dra. Ana Lúcia Fachin por acreditar e me dar a oportunidade de trabalhar com seu grupo de pesquisa, por ser amorosa e compreensiva como mãe, por me ensinar pacientemente e desenvolver o meu perfil como pesquisadora. Ao Prof. Dr. Mozart Marins meu eterno carinho e agradecimento, por sempre mostrar os melhores caminhos, por ser duro quando necessário, mas amoroso como um pai. Agradeço a CAPES e a UNAERP pela contribuição e financiamento.
- Obrigada Dra. Bruna Cantelli, pela paciência, amizade, compreensão, amor e carinho em toda essa jornada. Dra. Tatiane minha eterna inspiração, obrigada por me ensinar a como ser exigente e me fazer desenvolver cada dia mais. Dra. Mariana, meu eterno carinho como minha madrinha e amiga, obrigada por todos os ensinamentos.
- Laura Coletti, uma amiga e colega de trabalho que a pós-graduação me apresentou, minha eterna amizade e companheirismo. Gratidão pela paciência e por me ouvir, por estar comigo todos os dias, quando o dia era bom ou ruim. Desejo do fundo do meu coração que você voe muito alto, e que siga os seus sonhos, estarei daqui torcendo por você.
- Obrigada a cada um do grupo de pesquisa, que de alguma forma contribuíram para a minha evolução (Dr. Gabriel, Dra. Tamires, Dr. Felipe Teixeira, Dra. Viviane, Dr. Felipe, Dra. Flávia, Leticia Freire, Vinicius, Guilherme, Tayna, Stefani, Alessandra, Taiane).

Se todos aceitassem o primeiro “não”, o mundo seria um enorme silêncio,  
Autor desconhecido

## RESUMO

SEGURA, G.G. **Aspectos celulares, moleculares, nutricionais e epidemiológicos da caquexia associada ao câncer** 102f. 2023. Defesa de tese para obtenção do título de Doutor – Programa de pós-graduação em Biotecnologia Aplicada a Saúde, Universidade de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2023.

A caquexia é uma síndrome metabólica multifatorial de difícil identificação e definição, caracterizada pela perda de peso, da massa muscular e do tecido adiposo, acompanhado por processo inflamatório. Afeta mais de 50% de pacientes com câncer e é responsável por aproximadamente 20% das mortes em estágios avançados. Estudos sobre os polimorfismos genéticos de nucleotídeo único (SNPs) em genes envolvidos na regulação da resposta inflamatória, vias metabólicas do tecido muscular e adiposo, bem como vias de regulação do apetite, têm contribuído para o entendimento da suscetibilidade genética ao desenvolvimento da caquexia. Além disso, o FDA recentemente aprovou um kit de quantificação da citocina pró-inflamatória GDF-15 como ferramenta de diagnóstico para detecção da caquexia. O objetivo deste projeto foi investigar os aspectos moleculares, nutricionais e epidemiológicos da caquexia. Para isso, foram selecionados 90 pacientes oncológicos com perda de peso  $\geq 5\%$  e 29 com manutenção ou ganho de peso atendidos pelo SUS no Instituto Ribeirão Pretano de Combate ao Câncer. Foi realizada a coleta de sangue e a aplicação de um questionário para a coleta de dados pacientes oncológicos. Posteriormente, foram quantificados os níveis de GDF-15, comparando-se os pacientes oncológicos com os indivíduos saudáveis. Foi realizada a genotipagem dos polimorfismos dos genes FOXO3 (rs 1935949), FOXO3 (rs 4946935), GHRL (rs 42451), TLR4 (rs 1554973), TNF-ALFA (rs1799964), ECA (rs4291) através de sondas Taq Man específicas e PCR quantitativo. Os resultados mostraram que os pacientes com perda de peso apresentaram uma maior prevalência dos alelos de riscos para os SNPs rs4291, rs1935949, rs4946935 e rs42451. Por outro lado, os SNPs rs1799964 e rs1554973 não apresentaram relação significativa com a perda de peso dos pacientes. Quando se comparou os pacientes com ganho e perda de peso, observou-se uma associação significativa dos SNPs rs4291, rs1554973 e rs1935949 nos pacientes que apresentaram perda de peso. Além disso, os níveis de GDF-15 no soro dos pacientes com perda de peso foram significativamente mais elevados quando comparados ao grupo controle (ausência de câncer). Esses achados sugerem que os polimorfismos dos genes FOXO3 e ECA, juntamente com níveis elevados de GDF-15, podem desempenhar um papel importante no desenvolvimento da caquexia do câncer.

**Palavras chaves:** GDF-15. Caquexia. Qualidade nutricional. ECA, FOXO3.

## SUMMARY

Cachexia is a multifactorial metabolic syndrome that is challenging to identify and define, characterized by weight loss, muscle mass reduction, and decreased adipose tissue, often accompanied by an inflammatory process. It affects over 50% of cancer patients and contributes to approximately 20% of deaths in advanced stages. Studies on genetic single nucleotide polymorphisms (SNPs) in genes involved in the regulation of the inflammatory response, metabolic pathways in muscle and adipose tissue, as well as appetite regulation, have contributed to the understanding of genetic susceptibility to the development of cachexia. Additionally, the FDA recently approved a kit for quantifying the pro-inflammatory cytokine GDF-15 as a diagnostic tool for detecting cachexia. The objective of this project was to investigate the molecular, nutritional, and epidemiological aspects of cachexia. For this purpose, 90 cancer patients with weight loss of  $\geq 5\%$  and 29 with weight maintenance or gain were selected, and they were attended by the SUS at the Instituto Ribeirão Pretano de Combate ao Câncer. Blood collection was conducted, and a questionnaire was administered to collect data from cancer patients. Subsequently, GDF-15 levels were quantified, comparing cancer patients with healthy individuals. Genotyping of polymorphisms of the genes FOXO3 (rs 1935949), FOXO3 (rs 4946935), GHRL (rs 42451), TLR4 (rs 1554973), TNF-ALFA (rs1799964), ECA (rs4291) was performed using specific Taq Man probes and Quantitative PCR. The results indicated that patients with weight loss had a higher prevalence of risk alleles for the SNPs rs4291, rs1935949, rs4946935, and rs42451. Conversely, the SNPs rs1799964 and rs1554973 did not show a significant relationship with the patients' weight loss. When comparing patients with weight gain and loss, a significant association of the SNPs rs4291, rs1554973, and rs1935949 was observed in patients who experienced weight loss. Furthermore, GDF-15 levels in the serum of patients with weight loss were significantly higher when compared to the control group (those without cancer). These findings suggest that FOXO3 and ECA gene polymorphisms, along with elevated GDF-15 levels, may play an important role in the development of cancer cachexia.

**Keywords:** GDF-15. Cachexia. Nutritional quality. Weight loss. Genetic polymorphisms.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1: Steve Jobs, fundador da Apple, morreu no dia 5 de outubro de 2011 vítima de um câncer de pâncreas. Na imagem 1 podemos observar o empresário antes do diagnóstico e do tratamento, já na imagem 2 a foto mostra o empresário após o tratamento do câncer.....13
- Figura 2: Estágios da caquexia em pacientes oncológicos.....14
- Figura 3: Ciclos ineficientes da caquexia associada. As três características da caquexia do câncer são: (1) anorexia; (2) má absorção de nutrientes; (3) e controle metabólico perturbado. A anorexia é causada por complicações anatômicas, alterações endócrinas em mediadores derivados do hospedeiro e do tumor e intervenções terapêuticas (por exemplo, analgésicos opioides), enquanto a má absorção é alimentada por alterações no metabolismo dos ácidos biliares, disbiose, lesão epitelial secundária à terapia e motilidade intestinal desregulada. O elevado gasto energético resultante de um desequilíbrio entre os sinais anabólicos e catabólicos desencadeia a perda de tecidos. Os três princípios terapêuticos correspondentes na obesidade são: indução da saciedade (principalmente através de mecanismos centrais); perda de nutrientes (através de mecanismos intestinais e renais); e uma mudança metabólica para aumentar o gasto energético através da termogênese do tecido adiposo e do anabolismo muscular.....20
- Figura 4: Atuação dos fatores indutores da caquexia nos diferentes tecidos e o agravamento provocado pela quimioterapia.....23
- Figura 5: Os SNPs são o tipo mais comum de variação genética em seres humanos. Cada SNP representa uma diferença em um nucleotídeo. Por exemplo, um SNP pode substituir citosina por timina em um trecho específico de DNA. Os SNPs são considerados uma variação normal no DNA; eles respondem pelas diferenças na cor dos olhos humanos, cor do cabelo e tipo sanguíneo.....18
- Figura 6: Princípio da discriminação alélica utilizando o ensaio de genotipagem TaqMan® SNP.....20

Figura 7: Posição do rs4291 do gene ECA.....	23
Figura 8: Posição do rs1935949 do gene FOXO3.....	24
Figura 9: Posição do rs4946935 do gene FOXO3.....	24
Figura 10: Posição do rs42451 do gene da grelina.....	26
Figura 11: Posição do rs1554973 do gene TLR-4.....	27
Figura 12: Posição do rs1799964 do gene TNF- $\alpha$ .....	28
Figura 13: Via central de GDF-15/GFRAL na caquexia.....	30
Figura 14: Fluxograma do delineamento experimental.....	34
Figura 15: Diluição do anticorpo Standart (padrão) para avaliação e comparação dos níveis de GDF-15 do soro dos pacientes.....	39
Figura 16: Média do peso (Kg) (1) e do IMC (Kg/m <sup>2</sup> ) (2) do grupo 1 (perda ponderal de peso $\geq$ 5%) antes e após o diagnóstico oncológico. Teste T onde ****p<0,0005.....	46
Figura 17: Níveis de GDF-15 do soro de pacientes grupo 1 (perda ponderal de peso $\geq$ 5%) x grupo 3 (controle) (1) e os níveis de GDF-15 de acordo com a perda de peso do grupo 1, sendo de 4-9kg (A), 10-19kg (B) e mais de 20kg (C) comparado com o grupo 3 (2). Os valores são expressos em pg/mL após cálculo da média dos níveis dos pacientes e controle sendo comparados através do Mann Whitney teste (1) e ANOVA (2) onde ****p<0,0001; ***p<0,001; **p<0,01.....	49
Figura 18: (1) Níveis de GDF-15 quantificados de soro de pacientes do grupo 1 (n=83) subdivididos pelo sexo, onde “F” corresponde ao sexo feminino e “M” ao sexo masculino. (2) Níveis de GDF-15 do soro de pacientes grupo 1 (n=83) x grupo 3 (n=67). Níveis de	

GDF-15 de acordo com a perda de peso do grupo 1, sendo de 4-9kg (A), 10-19kg (B) e mais de 20kg (C) (3). Os valores foram expressos em pg/mL após cálculo da média dos níveis dos pacientes e controle sendo comparados através do Mann Whitney teste (1 e 2) e ANOVA (3) onde \*\*\*\*p<0,0001; \*\*\*p<0,001; \*\*p<0,01.....51

Figura 19: Níveis de GDF-15 quantificados de soro de pacientes do grupo 1 (n=83) subdivididos pela perda peso sendo: 4-9kg (A), 10-19kg (B) e mais de 20kg (C) comparado com o seu respectivo controle. Os valores foram expressos em pg/mL após cálculo da média dos níveis dos pacientes e controle sendo comparados através do teste T (1 e 3) e Mann Whitney teste (2) onde \*p<0,05 e \*\*\*p<0,001.....52

Figura 20: Polimorfismos rs4291 (ECA), rs4946935 (FOXO3), rs193549 (FOXO3), rs42451 (GHRL), rs1554973 (TLR4) e rs1799964 (TNF-alfa) analisados do grupo 1 (n=90). Teste  $\chi^2$  onde \*\*\*\*p<0,0001; \*\*p<0,007; \*p<0,02.....51

Figura 21: Níveis de GDF-15 quantificados de soro de pacientes do grupo 1 (n=83) subdivididos pela presença do alelo de risco do gene FOXO3 (rs4946935). Os valores são expressos em pg/mL após cálculo da média dos níveis dos pacientes sendo comparados através do teste Mann Whitney onde \*p<0,04.....53

Figura 22: Níveis de GDF-15 quantificados de soro de pacientes do grupo 1 (n=83) comparado com o grupo 3 (n=67) subdivididos pela presença do alelo de risco rs4291 (1), rs1799964 (2), rs4946935 (3), rs42451 (4), rs1554973 (5), rs1935949 (6). Os valores são expressos em pg/mL após cálculo da média dos níveis dos pacientes e controle sendo comparados através do teste Kruskal-Wallis onde \*\*\*\*p<0,0001..... 54

Figura 23: Níveis de GDF-15 quantificados de soro de pacientes do grupo 1 (n=83) de acordo com sinais e sintomas coletados de acordo com o questionário. Os valores foram expressos em pg/mL após cálculo da média dos níveis dos pacientes e do controle sendo comparados através do teste Kruskal-Wallis onde \*\*\*\*p<0,0001, \*\*\*p<0,001.....55

Figura 24: (1) Polimorfismos rs1554973 (TLR4) e rs42451 (GHRL) analisados do grupo 1 (n=90) subdivididos pelos sinais e sintomas coletados através dos questionários. Teste

$\chi^2$  onde \*\*\*p<0.0002 e \*\*p<0.002. (2) Polimorfismos rs4291 (ECA) e rs193549 (FOXO3) analisados do grupo 1 (n=90) subdivididos pelo estado nutricional calculado através do IMC com o peso atual dos pacientes. Teste  $\chi^2$  onde \*\*\*\*p<0.0001 e \*\*p<0.001.....56

Figura 25: Polimorfismos rs1554973 (TLR4), rs1935949 (FOXO3) e rs4291 (ECA) analisados no grupo 1 com câncer de mama (n=17) x grupo 2 (n=29). Teste Fisher onde \*\*\*\*p<0,0001; \*\*p<0,005; \*p<0,01. Polimorfismos rs1799964 (TNF- $\alpha$ ), rs42451 (GHRL) e rs4946935 (FOXO3) analisados do grupo 1 (n=17) x grupo 2 (n=29) que não apresentam diferença estatística. Teste Fisher.....57

Figura 26: Níveis de GDF-15 quantificados de soro de pacientes do grupo 1 com câncer de mama (n=17) comparado com os pacientes do grupo 2 (n=29). Os valores foram expressos em pg/mL após cálculo da média dos níveis dos pacientes sendo comparados através do teste Mann Whitney onde \*\*\*p<0.004.....58

Figura 27: Uma proposta da atuação dos SNPs na caquexia. O polimorfismo de ECA pode influenciar a AngII, que suprime a via de IGF-1. Isso por sua vez, inibe a via P13K/AKT, resultando na desativação e deslocamento de FOXO3 que ativa o sistema ubiquitina-proteassoma promovendo a degradação da massa muscular. E a interação complexa entre GDF-15 e a caquexia requer uma investigação mais profunda para compreender seus mecanismos e desenvolver estratégias terapêuticas eficazes.....76

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Descrição dos grupos de estudo para análise de citocinas e SNPs.....	35
Tabela 2: Concentrações de reagentes para a reação de PCR em tempo real.....	41
Tabela 3: Parâmetros de ciclagem para a reação.....	41
Tabela 4: n selecionado para cada grupo de estudo.....	43
Tabela 5: Características dos pacientes do grupo 1 (n=90) coletados para o estudo.....	44
Tabela 6: Tipos de tumores divididos por localização de acometimento (n=90) do grupo 1.....	44
Tabela 7: Tipos de tratamentos dos pacientes coletados (n=90) do grupo 1.....	44
Tabela 8: Caracterização dos pacientes do grupo 2 (n=23) .....	45
Tabela 9: Classificação do estado nutricional de acordo com a OMS (2000) e OPAS (2001) dos pacientes (n=90) do grupo 1, sendo o inicial o peso antes do diagnóstico e o final o peso após o tratamento (início do tratamento/data da coleta) .....	46
Tabela 10: Sinais e sintomas relatados pelo grupo 1 (com perda de peso $\geq 5\%$ ) durante o tratamento ou após o diagnóstico médico (n=90) .....	47
Tabela 11: Caracterização dos pacientes do grupo 2 (n=29) .....	48
Tabela 12: Caracterização dos pacientes do grupo 2 (n=29) .....	49
Tabela 13: Classificação do estado nutricional de acordo com a OMS (2000) e OPAS (2001) dos pacientes do grupo 2 (n=29), sendo o final o peso registrado através do prontuário no dia da coleta .....	49

Tabela 14: Genes com suas variantes de significância. OR (odds ratio) .....57

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
<b>1.1 Câncer .....</b>	<b>14</b>
1.1.1 Epidemiologia.....	16
1.1.2 Tratamentos do câncer e suas consequências .....	17
<b>1.2 Caquexia: uma síndrome mal compreendida .....</b>	<b>18</b>
1.2.1 Mecanismos da caquexia e a síndrome do desperdício de energia .....	20
<b>1.3 Polimorfismos genéticos.....</b>	<b>23</b>
1.3.1 Técnicas e diagnósticos através da genotipagem .....	24
1.3.2 Polimorfismos genéticos na caquexia .....	27
1.3.3 Enzima conversora de angiotensina (ECA).....	28
1.3.4 Gene Forkhead box O (FOXO) .....	29
1.3.5 Grelina (GHRL).....	31
1.3.6 Receptor do tipo Toll-like 4 (TRL-4).....	32
1.3.7 Fator de necrose tumoral – $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) .....	33
<b>1.4 GDF-15, um biomarcador para a caquexia? .....</b>	<b>35</b>
<b>2. HIPÓTESE.....</b>	<b>38</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>39</b>
<b>3.1 OBJETIVO GERAL .....</b>	<b>39</b>
<b>3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....</b>	<b>39</b>
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>40</b>
<b>4.1 Delineamento Experimental .....</b>	<b>40</b>
<b>4.2 Local de desenvolvimento do estudo e descrição da amostra .....</b>	<b>41</b>
4.2.1 Caracterização e entrevista do grupo 1 .....	42
4.2.2 Caracterização do grupo 2 .....	43
4.2.3 Controles.....	44
<b>4.5 Coleta de sangue.....</b>	<b>44</b>
<b>4.6 Quantificação de GDF-15.....</b>	<b>45</b>
<b>4.7 Extração de DNA do sangue total .....</b>	<b>46</b>
<b>4.8 Genotipagem dos Polimorfismos de único nucleotídeo (SNPs).....</b>	<b>46</b>
<b>4.9 Análise dos dados .....</b>	<b>47</b>
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>49</b>
<b>5.1 Características gerais dos pacientes do grupo 1 .....</b>	<b>49</b>
<b>5.2 Perda ponderal de peso dos pacientes do grupo 1 .....</b>	<b>51</b>
<b>5.3 Sinais e sintomas relatados pelo grupo 1.....</b>	<b>52</b>
<b>5.4 Características gerais dos pacientes do grupo 2 .....</b>	<b>54</b>
<b>5.4 Quantificação dos níveis circulantes de GDF-15 na perda de peso .....</b>	<b>55</b>
<b>5.5 Polimorfismos Genéticos relacionados com a perda de peso.....</b>	<b>57</b>
<b>5.6 Análise comparativa dos dados .....</b>	<b>57</b>
5.6.1 GDF-15 e as possíveis associações com os pacientes.....	58
5.6.2 SNPs e as possíveis associações com os dados clínicos dos pacientes.....	60
<b>5.7 Existe diferença entre os polimorfismos nos pacientes com perda e ganho de peso?.....</b>	<b>61</b>
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>64</b>
<b>6.1 Características dos pacientes oncológicos .....</b>	<b>64</b>

<b>6.2</b>	<b>Peso dos pacientes oncológicos selecionados para o estudo .....</b>	<b>66</b>
<b>6.3</b>	<b>Aspectos genéticos da caquexia.....</b>	<b>68</b>
<b>6.4</b>	<b>Níveis de GDF-15 estão aumentados nos pacientes oncológicos com perda de peso.....</b>	<b>72</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>75</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>77</b>
	<b>ANEXO 1.....</b>	<b>85</b>
	<b>ANEXO 2.....</b>	<b>86</b>
	<b>ANEXO 3.....</b>	<b>87</b>
	<b>APÊNDICE 1 .....</b>	<b>88</b>
	<b>APÊNDICE 2 .....</b>	<b>91</b>
	<b>APÊNDICE 3 .....</b>	<b>94</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Câncer

A denominação “câncer” tem sua origem em uma observação feita por Hipócrates há mais de 2300 anos, resultando dos termos “carcinomas” em grego e “câncer” em latim posteriormente. Estudos conduzidos por Hooke (1600) e Virchow (1800) demonstraram que as células são descendentes diretas de outras células, o que deu início a uma série de pesquisas para compreender como células saudáveis se transformam em células cancerosas (NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, 2007)

O conceito do câncer como uma doença genética surgiu em 1970, após os estudos de Otto Warburg, que relatou que as células cancerosas apresentavam um fenótipo metabólico caracterizado por um aumento no consumo de glicose, conhecido como “efeito Warburg” (LI *et al.*, 2016).

Inicialmente, o câncer foi investigado como um distúrbio metabólico e posteriormente como doença genética. Atualmente, o conceito metabólico está sendo retomado e é respaldado por avanços nas tecnologias de sequenciamento aprimoradas, juntamente com o aumento de dados genéticos e uma maior acessibilidade à metabolômica. Essas melhorias levaram à descoberta dos oncometabólitos, que são metabólitos celulares endógenos que se acumulam em tumores, sustentando o crescimento do tumor e a metástase (LIBERTI *et al.*, 2016; GYAMFI; KIM, CHOI, 2022).

O câncer é atualmente considerado um conjunto de mais de 100 doenças que se desenvolvem ao longo do tempo por meio de complexas mutações genéticas e alterações epigenéticas, resultando na divisão descontrolada das células. Esse desenvolvimento celular pode ocorrer em qualquer tecido, uma vez que os processos iniciais de progressão são semelhantes, porém cada tipo de tumor tem sua peculiaridade (UPADHYAY, 2021)

As células cancerosas podem surgir de mutações nucleares, sendo a perda da capacidade de controle de crescimento a principal modificação celular, resultando em instabilidade genômica nuclear. Nesse contexto, dois grupos de genes são importantes: proto-oncogenese (estimula a divisão celular através de proteínas que processam crescimento celular) e supressores de tumor (inibe o crescimento). Através das mutações, os proto-oncogenes se tornam oncogenes, estimulando o crescimento e

desenvolvimento celular, além de inibir os genes supressores de tumor, favorecendo a atuação dos oncogenes (NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, 2007).

A exposição a carcinógenos, erros na reparação do DNA e o envelhecimento podem aumentar a probabilidade de desenvolvimento de câncer por meio da formação dos campos cancerizados. As células saudáveis sofrem mutações que resultam na formação desses campos, nos quais um grupo de células constitui um ambiente propício para o desenvolvimento do tumor e podem modificar o microambiente celular por meio da interação com as células tumorais. Esse microambiente tumoral pode determinar mutações subsequentes, favorecendo o crescimento e sobrevivência dessas células mutantes, além de gerar alterações fenotípicas que sustentam o campo cancerizado. O desenvolvimento do câncer ocorre ao longo de um período prolongado, o que significa que a tumorigênese ocorre muito antes da detecção de uma lesão na fase adulta (CURTIUS; WRIGHT; GRAHAM, 2018).

O microambiente tumoral emergente é estimulado pelas células tumorais por meio de mudanças moleculares e físicas, dependendo do tipo de tumor, promovendo positivamente o seu crescimento (ANDERSON; SIMON, 2021). Esse microambiente é composto por células imunes, como células B, células T, macrófagos, neutrófilos e células dendríticas, que estimulam o crescimento do tumor através da inflamação crônica. Além disso, células estroma como células endoteliais, adipócitos e fibroblastos estão presentes nesse ambiente, secretando fatores que promovem a angiogênese, proliferação, invasão e metástase, juntamente com vasos sanguíneos e matriz extracelular. (BAGHBAN *et al.*, 2020).

Essas alterações desencadeiam a angiogênese, visando suprir as demandas de nutrientes e oxigênio das células cancerígenas, favorecendo o seu desenvolvimento, bem como os eventos genéticos que regem o início da progressão, da metástase, resposta à terapia e o surgimento de resistência a medicamentos (ANDERSON; SIMON, 2021).

Em resumo o processo de formação e progressão do tumor é influenciado principalmente por dois fatores: as alterações genéticas e epigenéticas nas células tumorais e a formação do microambiente emergente tumoral, sustentado pelo campo cancerizado. O *crosstalk* entre esses elementos ocorre por meio de citocinas, quimiocinas, enzimas, células tumorais circulantes, exossomos e DNA livre de células BAGHBAN *et al.*, 2020).

### 1.1.1 Epidemiologia

O câncer representa um grave problema de saúde pública, sendo uma das principais causas de mortes em todo o mundo e uma das principais barreiras para o aumento da expectativa de vida. De fato, é a segunda causa de mortes antes dos 70 anos (SANTOS *et al.*, 2023). As atuais transições geográficas e epidemiológicas, como o aumento da expectativa de vida, mudança do comportamento alimentar e alterações ambientais que afetam diretamente na alimentação, exposição a poluentes e estilo de vida, estão acelerando a incidência e a mortalidade pelo câncer (WILD *et al.*, 2020)

Após as doenças cardiovasculares, o câncer é a segunda causa de morbidade e mortalidade nas Américas. Estima-se que em 2020, quatro milhões de pessoas foram diagnosticadas com câncer e 1,4 milhões de pessoas faleceram em decorrência da doença, sendo que 57% dos casos novos e 47% das mortes ocorreram em pessoas com menos de 69 anos. Projeções indicam que até 2040 haverá cerca de trinta milhões de novos casos no mundo, com maior impacto em países de baixa e média renda. Nas américas, estima-se aproximadamente 6,3 milhões de novos diagnósticos de câncer, caso nenhuma ação de prevenção seja implementada (OPAS, 2023).

Estima-se que o Brasil terá aproximadamente 483 mil novos casos de câncer entre 2023-2025, afetando 49,5% dos homens e 50,5% em mulheres. O câncer de mama e próstata representarão 15% dos novos casos, seguido por câncer de colón e reto (9,4%), pulmão (6,7%), estômago (4,4%) e colo do útero (3,5%). O câncer de próstata é o mais comum entre os homens, seguido pelo câncer de colón e reto, enquanto nas mulheres, o câncer de mama continua sendo o mais prevalente, seguido do câncer de colón e reto (PRIMO, 2023; INCA *et al.*, 2023).

A pandemia da doença do coronavírus (COVID-19), que começou em 2019, resultou em atrasos no diagnóstico e tratamento do câncer devido à interrupção dos serviços de saúde. Como resultado, houve um aumento estágio da doença e na mortalidade devido aos atrasos no diagnóstico dos pacientes. Conseqüentemente, os números de novos casos e os dados para projeção da doença foram afetados pelo impacto da pandemia (SIEGEL *et al.*, 2023).

### 1.1.2 Tratamentos do câncer e suas consequências

As abordagens convencionais para o tratamento do câncer envolvem a ressecção cirúrgica, radioterapia e/ou quimioterapia. A escolha do tratamento depende do tipo de câncer e do estadiamento da doença (GLOBALSURG COLLABORATIVE; NATIONAL INSTITUTE FOR HEALTH RESEARCH GLOBAL HEALTH RESEARCH UNIT ON GLOBAL SURGERY, 2021). Com o avanço dos estudos nessa área, novas abordagens têm ganhado destaque, como o uso combinatório de drogas, múltiplas terapias, terapias moleculares e imunes que tem direcionado o tratamento (MOKHTARI *et al.*, 2017).

A quimioterapia é um tratamento baseado em drogas que afetam principalmente a síntese macromolecular e a função das células cancerosas, interferindo na síntese do DNA, RNA, proteínas ou funcionamento celular. Quando a interferência na síntese ou função macromolecular é suficiente, ocorre a morte celular por efeito direto da quimioterapia ou por desencadear a apoptose. Com o uso de agentes tradicionais, a morte celular pode ser retardada, pois apenas uma proporção das células pode morrer devido ao tratamento. No entanto, pode ser necessário repetir o uso do medicamento para obter uma resposta adequada (AMJAD; CHIDHARLA; KASI, 2023).

O tratamento com agentes quimioterápicos desempenha um papel crucial na redução da morbidade e mortalidade de muitos pacientes, podendo ser administrados por via oral, intravenosa, subcutânea, intramuscular e intratecal. A administração intravenosa é a mais comum devido a taxa de absorção, além de permitir o metabolismo e excreção dos medicamentos pelo fígado ou rins.

No entanto, os quimioterápicos podem afetar células saudáveis e levar ao desenvolvimento de resistência ao tratamento, além de provocar efeitos colaterais e sinais de toxicidade. Entre os efeitos colaterais estão a imussupressão, mielossupressão, mucosite, náusea, vômito, diarreia, alopecia, fadiga, esterilidade, infertilidade, reações à infusão, e um maior risco de infecções devido à supressão do sistema imunológico (MONDAL *et al.*, 2014; SHAPIRA *et al.*, 2011) A intensidade da toxicidade pode ser avaliada de acordo com uma classificação da OMS, que varia de leve (grau 1) a moderada (grau 2), grave (grau 3) ou potencialmente fatal ou incapacitante (grau 4) (SCHIRRMACHER, 2017; KOEPPEN, STANTON, 2018).

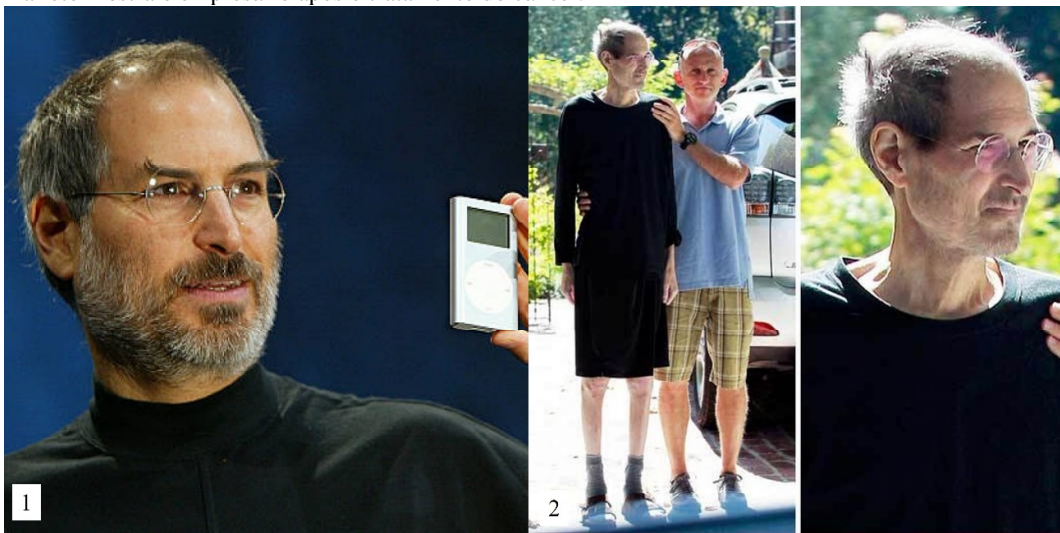
Embora a quimioterapia seja o principal tipo de tratamento anticâncer, é importante destacar que ela pode apresentar diversos efeitos colaterais e consequências, incluindo o desenvolvimento da síndrome da caquexia associada ao câncer, um tema atualmente estudado devido ao seu impacto no tratamento e na qualidade de vida do paciente oncológico.

## 1.2 Caquexia: uma síndrome mal compreendida

O organismo do paciente oncológico passa por modificações decorrentes das terapias e da própria doença, resultando em diversas alterações na vida dos pacientes. Conforme a patologia progride e o tempo de tratamento avança, é comum que os pacientes desenvolvam uma síndrome conhecida como caquexia induzida pelo câncer (ROGERS; SYED; MINTEER, 2022).

A caquexia é uma síndrome metabólica e multifatorial caracterizada pela perda de massa muscular, com ou sem perda de massa gorda. Nesse processo, ocorre uma perda de peso progressiva e não intencional, associada a anorexia, processo inflamatório, resistência à insulina e quebra de aminoácidos do tecido muscular (EVANS *et al*, 2008; FEARON *et al*, 2011) (figura1).

**Figura 1:** Steve Jobs, fundador da Apple, morreu no dia 5 de outubro de 2011 vítima de um câncer de pâncreas. Na imagem 1 podemos observar o empresário antes do diagnóstico e do tratamento, já na imagem 2 a foto mostra o empresário após o tratamento do câncer.

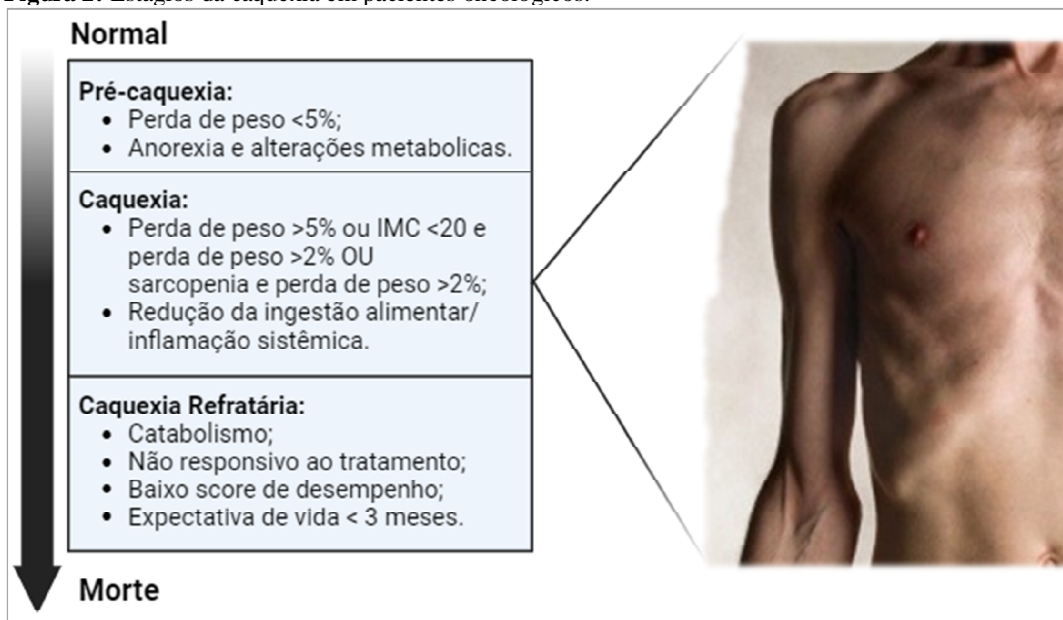


Fonte: Google Imagens

Em alguns tipos de câncer, a prevalência de caquexia em estágios avançados chega a ser de quase 80%, sendo responsável por aproximadamente 30% das mortes (FEARON *et al.*, 2011; TISDALE *et al.*, 2002). Em casos de câncer terminal, a caquexia é diretamente responsável por 22% das mortes (SKIPWORTH *et al.*, 2007).

A caquexia no câncer é dividida em três estágios (figura 2) e a progressão da síndrome varia de acordo com a localização do tumor, estágio tumoral, tipo de tratamento, ingestão de alimentos e gravidade da inflamação.

**Figura 2:** Estágios da caquexia em pacientes oncológicos.



**Fonte:** Adaptado Fearon *et al.*, (2011).

\*IMC = Índice de Massa Corporal

A perda de peso, especialmente da massa muscular, não é completamente revertida por meio de terapia nutricional convencional. Por exemplo, na desnutrição, a identificação e o tratamento precoce podem retardar a progressão da síndrome e amenizar sintomas como redução da ingestão de alimentos, diminuição da função física, náusea, vômito e *turnover* de proteínas musculares. Além disso, a perda de força muscular associado à perda de peso é um preditor de mortalidade em pacientes com câncer (BARRETO *et al.*, 2016).

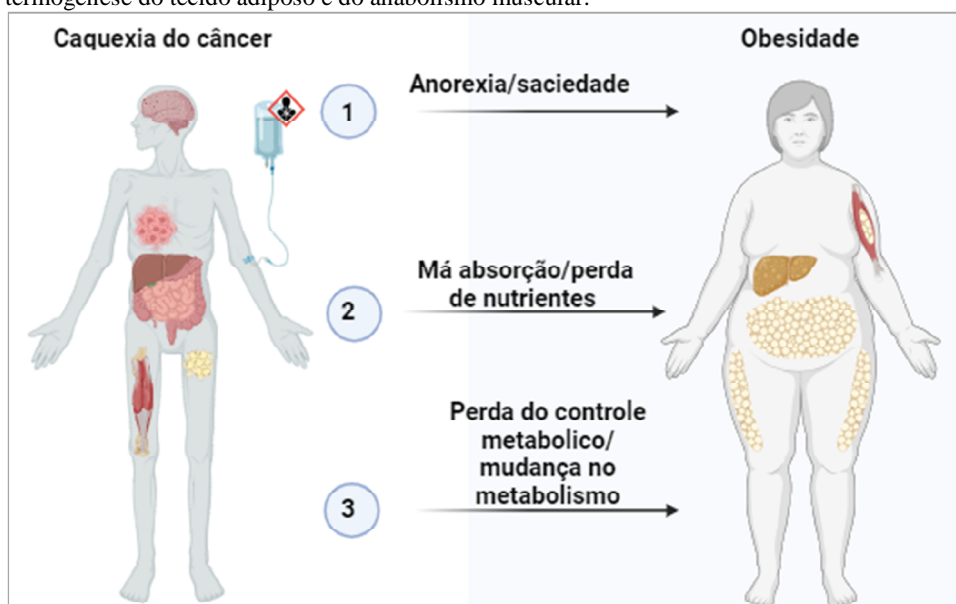
O impacto da caquexia não se limita apenas à perda de peso e redução da ingestão alimentar. Está também relacionada à resistência ao tratamento quimioterápico, aumento da toxicidade, fraqueza, fadigas graves, complicações pós cirúrgicas, piora do

prognóstico, redução da qualidade de vida e sobrevivência, causando um impacto dramático na vida do paciente (DEWYS *et al.*, 1980; TAN *et al.*, 2008). Nesse contexto, a caquexia é uma síndrome que leva a um aumento dos custos médicos devido ao declínio do estado do paciente e ao aumento dos cuidados intensivos (GOURIN; COUCH; JOHNSON, 2014; ARTHUR *et al.*, 2016).

### 1.2.1 Mecanismos da caquexia e a síndrome do desperdício de energia

A perda de peso observada na caquexia do câncer ocorre devido ao consumo do músculo esquelético e tecido adiposo, resultando no desequilíbrio entre a síntese e degradação de proteínas. Esse processo é impulsionado pelo aumento do gasto energético em repouso no estado caquético, contribuindo para o processo de desperdício por meio de ciclos metabólicos ineficientes (VAUGHAN *et al.*, 2013) (figura 3).

**Figura 3:** Ciclos ineficientes da caquexia associada. As três características da caquexia do câncer são: (1) anorexia; (2) má absorção de nutrientes; (3) e controle metabólico perturbado. A anorexia é causada por complicações anatômicas, alterações endócrinas em mediadores derivados do hospedeiro e do tumor e intervenções terapêuticas (por exemplo, analgésicos opioides), enquanto a má absorção é alimentada por alterações no metabolismo dos ácidos biliares, disbiose, lesão epitelial secundária à terapia e motilidade intestinal desregulada. O elevado gasto energético resultante de um desequilíbrio entre os sinais anabólicos e catabólicos desencadeia a perda de tecidos. Os três princípios terapêuticos correspondentes na obesidade são: indução da saciedade (principalmente através de mecanismos centrais); perda de nutrientes (através de mecanismos intestinais e renais); e uma mudança metabólica para aumentar o gasto energético através da termogênese do tecido adiposo e do anabolismo muscular.



Fonte: Adaptado Jaschke; Rachner, 2023.

A presença de inflamação sistêmica e um balanço energético negativo são características marcantes na caquexia. Um possível mecanismo proposto para a síndrome é a mobilização de substratos energéticos como resultado dessa inflamação, levando ao aumento do gasto energético em repouso (STRAUB *et al.*, 2010). Citocinas pró-inflamatórias desempenham um papel de importante nesse processo, atuando na imunomodulação, induzindo respostas e sinalização para o sistema nervoso central e tecidos periféricos, resultando em alterações metabólicas (SKIPWORTH *et al.*, 2007).

Na caquexia do câncer, a produção excessiva de citocinas, como IL-1, IL-6, IL-2, interferon- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , tem sido amplamente descrita na literatura. Essas citocinas ativam vias que promovem catabolismo muscular, incluindo a ativação do fator de transcrição nuclear kB, que reduz a síntese proteica, a redução da proteína MyoD, responsável por modular as vias de sinalização para desenvolvimento muscular, e alteração do sistema proteolítico mediado por ubiquitina (MOLDAWER; COPELAND, 1997; MURHY *et al.*, 2011).

O aumento do gasto energético em repouso na caquexia é multifatorial e envolve vários fatores, como a mobilização de substratos energéticos pelos tecidos ativos (tecido adiposo e muscular), redução da eficiência energética, competição por energia com o tumor, aumento da resposta imune e da inflamação (FALCONER *et al.*, 1994).

Essas alterações metabólicas resultam em aumento da frequência cardíaca, o que implica na ativação do sistema nervoso simpático e aumento da demanda energética. Além disso, há uma maior demanda de glicose, levando ao aumento do metabolismo anaeróbico, maior captação de glicose, glicólise e produção de lactado (LIBERTI; LOCASALE *et al.*, 2016).

O efeito de Warburg, que resulta na produção de lactado pelo tumor, e o ciclo de cori, que envolve a captação hepática do lactato e sua conversão em glicose, são processos importantes na fisiologia tumoral (LIBERTI; LOCASALE, 2016). No entanto, essa via é ineficiente, uma vez que a conversão de glicose em lactato requer um alto consumo de energia e resulta em menor produção de ATP (CRUZ-LÓPEZ *et al.*, 2019)

O músculo esquelético é um tecido amplamente estudado na caquexia, devido à sua importância em alguns processos biológicos como a respiração, os batimentos cardíacos e a movimentação. O desequilíbrio entre a síntese e a degradação proteica, causada pela progressão tumoral, pode aumentar a inflamação sistêmica e a liberação de

citocinas pro-inflamatórias, interrompendo a regulação do sistema anabólico e catabólico (COLE *et al.*, 2018; WEBSTER *et al.*, 2020).

Esse desequilíbrio pode ser atribuído a liberação de mediadores inflamatórios, vias de sinalização, anormalidades na expressão de angiotensina II, IGF-1, receptores no músculo e proteínas quinases. Além disso, podem ocorrer alterações na dinâmica mitocondrial do músculo esquelético, como redução da capacidade oxidativa e fluidez da membrana, resultando em deficiências mitocondriais (YOSHIDA; DELAFONTAINE, 2020; ARJUNAN *et al.*, 2023).

O tecido adiposo desempenha um papel importante na caquexia, apresentando funções alteradas nessa síndrome. Isso pode ser explicado pelo escurecimento do tecido adiposo branco em bege e/ou marrom, o que aumenta a termogênese pelo calor e consumo de energia por meio da geração de calor. Além disso, no tecido adiposo ocorre a mobilização de ácidos graxos livres e glicerol devido ao aumento da atividade lipolítica das enzimas triglicérido lipase adiposa e lipase hormônio sensível, enquanto a atividade lipase lipoproteica, que atua na lipogênese, é inibida (PETRUZZELLI *et al.*, 2014; ARNER; LANGIN, 2014). Um estudo conduzido por SHELLOCH; RIEDINGER; FISHBEIN (1986) observou a presença do tecido adiposo marrom em 80% dos pacientes caquéticos por meio de amostras de autópsia, confirmando a existência desse tecido em casos de caquexia.

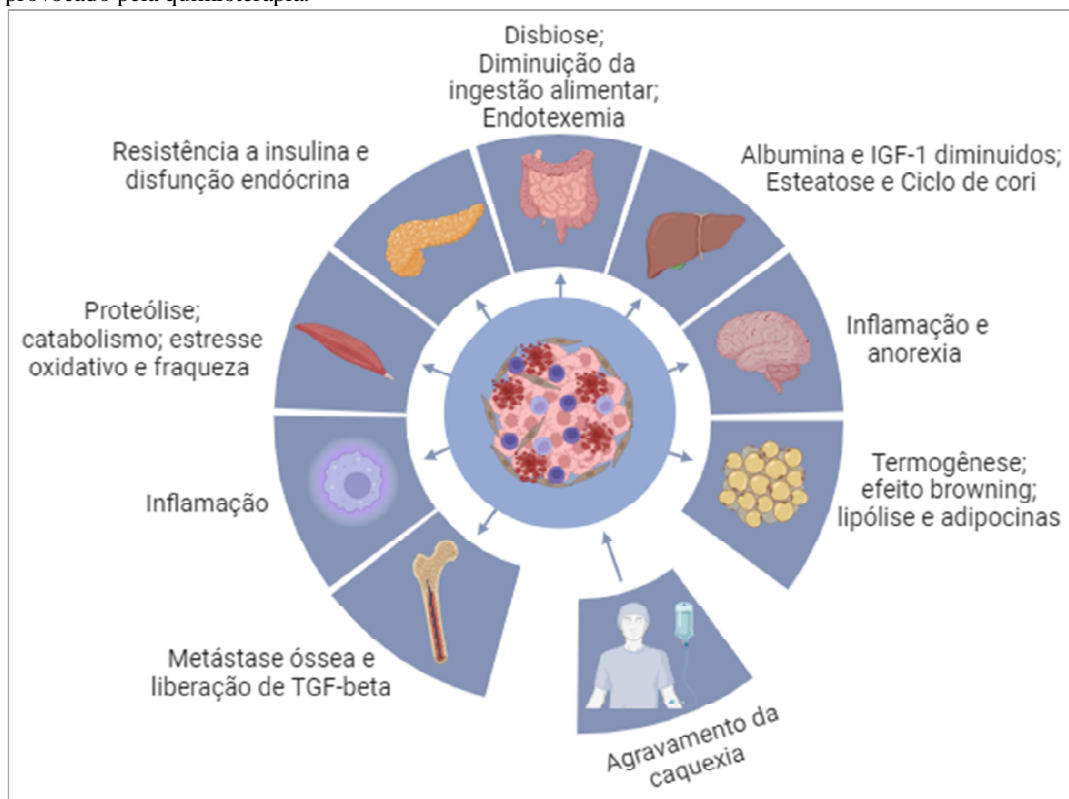
Além disso, relatos na literatura sugerem que agentes quimioterápicos contribuem para o desenvolvimento e progressão da caquexia e o tratamento pode causar perda e fraqueza muscular (GILIAM; CLAIR, 2011). Em pacientes, a caquexia que se desenvolve durante a quimioterapia está associada a um prognóstico pior e favorece vias que aumentam o gasto energético em repouso (KIMURA *et al.*, 2015).

LE BRICON *et al.*, (1995) demonstraram que agentes quimioterápicos, como ciclofosfamida e cisplatina, induzem um balanço nitrogenado negativo em ratos saudáveis, resultando em uma perda de peso. DAMREUER *et al.*, (2008) relataram que a cisplatina tem capacidade de ativar NF- $\kappa$ B, que por sua vez ativa o sistema de ubiquitina-proteassoma, levando à perda de massa muscular. BARRETO *et al.*, 2015 observaram atrofia das fibras musculares, fadiga e perda de peso em camundongos tratados com 5-FU, além disfunções na atividade mitocondrial.

De acordo com O'DONOGHUE *et al.*, 2019, aproximadamente 40% dos pacientes diagnosticados com câncer gastrointestinal, pancreático, colorretal e pulmonar

desenvolvem caquexia após o início do tratamento quimioterápico. Alguns relatos na literatura, como os mencionados anteriormente, sugerem que o tratamento quimioterápico pode contribuir e aumentar a probabilidade de um paciente oncológico desenvolver a síndrome da caquexia, embora os mecanismos envolvidos ainda não estejam claros (figura 4).

**Figura 4:** Atuação dos fatores indutores da caquexia (CIFs) nos diferentes tecidos e o agravamento provocado pela quimioterapia.



**Fonte:** Adaptado de BERARDI *et al.*, 2021 e POROPORATO, 2016.

### 1.3 Polimorfismos genéticos

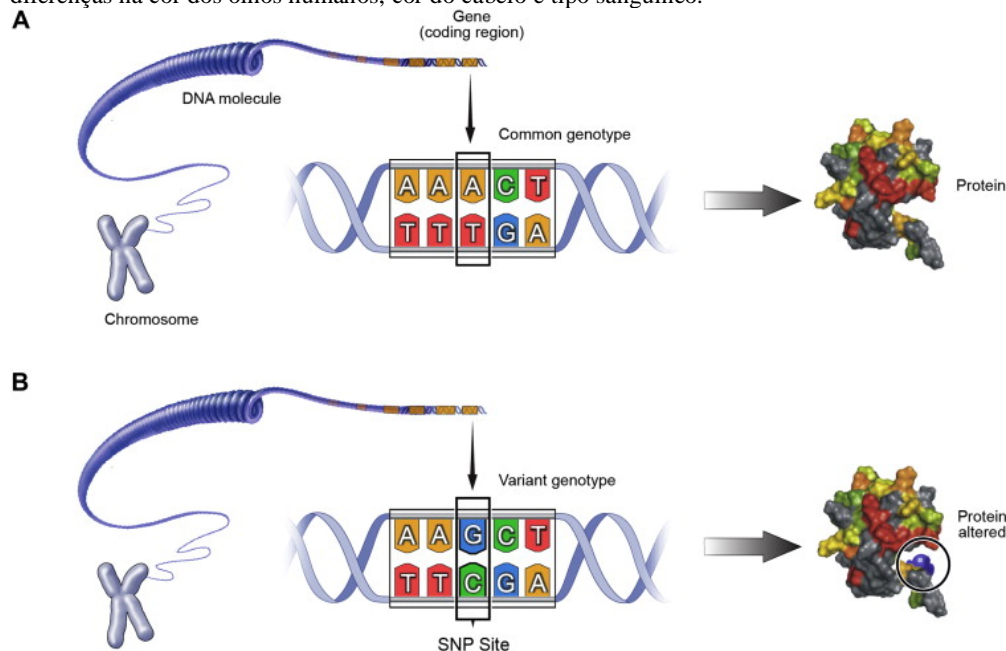
Alguns pesquisadores estão explorando a associação entre os marcadores genéticos com a caquexia, com ênfase na busca de genes preditivos para a prevenção. A contribuição genética nessa síndrome é complexa, envolvendo componentes genéticos e ambientais.

Os polimorfismos genéticos são modificações na sequência do DNA de um indivíduo ou população, podem ter um efeito significativo no fenótipo humano. Entre essas modificações, destacam-se os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) (figura

5), que se referem a alterações de um único par de bases na sequência do DNA (SOMAIA; MONA, 2012).

Os SNPs podem alterar a expressão gênica, a estabilidade do RNA mensageiro e funções das proteínas, desempenhando um papel importante em doenças como diabetes, obesidade, hipertensão e distúrbios psiquiátricos. Existem SNPs neutros ou normais, que não causam alterações fenotípicas e funcionais, e SNPs variantes, nos quais não está claro se pode ocorrer alguma disfunção na troca das bases. A identificação e análise desses SNPs podem levar a uma melhor compreensão dos seus efeitos na expressão gênica de genes relacionados a doenças. Os estudos sobre os SNPs podem possibilitar diagnósticos e tratamentos personalizados (BULL, 2013).

**Figura 5:** Os SNPs são o tipo mais comum de variação genética em seres humanos. Cada SNP representa uma diferença em um nucleotídeo. Por exemplo, um SNP pode substituir citosina por timina em um trecho específico de DNA. Os SNPs são considerados uma variação normal no DNA; eles respondem pelas diferenças na cor dos olhos humanos, cor do cabelo e tipo sanguíneo.



**Fonte:** Adaptado Kathryn; Trujillo (2014).

### 1.3.1 Técnicas e diagnósticos através da genotipagem

O mapeamento do genoma humano envolve a localização dos genes nos cromossomos e o sequenciamento do DNA de cada cromossomo (COOPER *et al.*, 1985). Existem dois tipos principais de mapas: genéticos e físicos. O mapa genético indica a distância entre os genes com base em sua transmissão em famílias. Já os mapas físicos

são baseados em medidas de moléculas de DNA. Os primeiros estudos sobre mapeamento genômico datam do início do século XX, com a descoberta da herança ligada ao cromossomo X. O primeiro segmento de mapa foi delineado no cromossomo X em 1936 e 1937, por Haldane e Bell. Foi somente em 1951, que Mohr, determinou a distância genética entre genes autossômicos foi determinada (LIPPMAN, 1992).

O avanço do conhecimento do mapa do genoma humano depende de metodologias de laboratório, análise de ligação genética e o uso de bioinformática. Em 1993, Cuticchia et al., destacaram a importância da informática e mencionaram bases de dados como *GenBank*, *Genome Data Base* e *Protein Information Resource*. Em 1990, foi lançado o Projeto do Genoma Humano nos EUA que foi iniciado pela união de programas existentes nos institutos Nacionais de Saúde (NIH) e no Departamento de Energia (DOE), com o objetivo de mapear o genoma humano.

O Projeto Genoma Humano publicou o primeiro rascunho do genoma humano em 2001, após 20 anos de trabalho e um custo de US\$ três bilhões. A sequência completa do genoma foi concluída em 2003 e o número de genes humanos era menor do estimado. Desde então, muitos genomas foram sequenciados, variando de bactérias a mamíferos. Os avanços tecnológicos reduziram significativamente o custo do sequenciamento ao longo do tempo. No entanto, os desafios incluem análises bioinformáticas, dados e interpretação de resultados para aplicação na rotina na clínica.

Existem várias técnicas de identificação de SNPs usadas para detectar variações genéticas nos organismos. Essas técnicas incluem o uso de bancos de dados de sequência, análise de *arrays*, resequenciamento de *amplicons*, genomas resequenciados e tecnologia de sequenciamento de nova geração (NGS). A escolha da técnica depende da aplicabilidade, necessidade e limitações dos métodos (VIGNAL *et al.*, 2002; GANAL *et al.*, 2009)

Dois tecnologias amplamente utilizadas são a genotipagem e o sequenciamento. A genotipagem examina variações genéticas no genoma para identificar a presença de SNPs associados à predisposição a doenças. Em contraste, o sequenciamento de DNA abrange praticamente todo o DNA, permitindo a detecção de mutações somáticas e germinativas. A principal distinção entre essas abordagens é que a genotipagem determina a presença ou ausência de SNPs, enquanto o sequenciamento lê a sequência do DNA base por base (KWORK; CHEN, 2003).

Existem cerca de dez milhões de SNPs na população, alguns deles afetam a função dos genes ou proteínas, contribuindo para a suscetibilidade a doenças. A genotipagem é geralmente mais acessível em termos de custos, o ensaio de genotipagem TaqMan® SNP (figura 6) é uma técnica comumente utilizada que permite a detecção de diferentes alelos de um SNP específico por meio de sondas marcadas com corantes e é baseado no princípio de transferência de energia de ressonância de fluorescência. Após a identificação dos SNPs associados a doenças, é necessário investigações mais profundas e verificar esses potenciais alelos de risco usando amostras independentes da população (SCHLEINITZ; DISTEFANO; KOVACS, 2014).

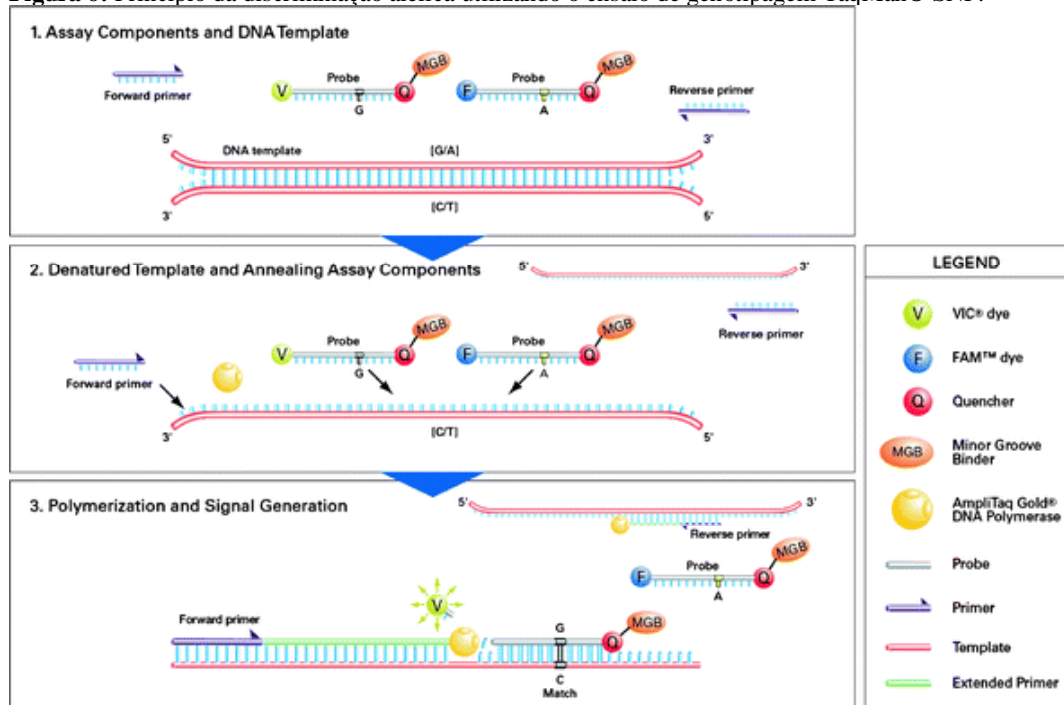
Como essas amostras de estudo geralmente englobam muitos indivíduos para obtenção de uma estatística populacional coerente, a triagem em larga escala requer técnicas com baixo custo, eficientes e com mínimo de etapas. A genotipagem baseada em PCR, fornece um procedimento econômico e do fácil manuseio para geração de milhares de genótipos (SCHLEINITZ; DISTEFANO; KOVACS, 2014).

O método envolve o uso de primers *forward* e *reverse* para amplificar a sequência polimórfica de interesse, e duas sondas com corante VIC®, que detecta o alelo 1, enquanto a outra é marcada pelo corante 6FAM™ (6'-carboxyfluorescein), que detecta o alelo 2. Esses corantes também são conhecidos como corantes *reports* (SCHLEINITZ; DISTEFANO; KOVACS, 2014).

Com base no princípio de transferência de energia de ressonância de fluorescência, as sondas possuem um supressor não fluorescente (NFQ) na posição 3', que absorve a energia dos corantes *reports* quando ambos estão ligados à sonda em proximidade espacial. Além disso, as sondas incorporam um ligante MGB (*dihydrocyclopyrroloindole tripeptide*) na extremidade 3', que se liga ao sulco menor da hélice do DNA, melhorando a estabilidade do complexo sonda/modelo e aumentando a especificidade em comparação ao DNA não modificado.

Essa estabilização permite o uso de ondas curtas. Após a desnaturação do molde e anelamento dos componentes do ensaio, a *Taq* polimerase inicia a síntese de uma nova fita de DNA. Durante a reação, a polimerase encontra a sonda hibridizada e o corante fluorescente ligado à sonda apropriada é separado devido à atividade exonuclease 5' → 3' da enzima *Taq*, e nesse ponto o sinal de fluorescência pode ser detectado (SCHLEINITZ; DISTEFANO; KOVACS, 2014).

**Figura 6:** Princípio da discriminação alélica utilizando o ensaio de genotipagem TaqMan® SNP.



Fonte: Adaptado SCHLEINITZ; DISTEFANO; KOVACS (2014).

### 1.3.2 Polimorfismos genéticos na caquexia

O diagnóstico da caquexia envolve uma variedade de análises e avaliações, e essa complexidade pode resultar em um diagnóstico tardio, quando o estado geral do paciente já não pode ser revertido. Portanto, um diagnóstico precoce e/ou preventivo permitiria a profilaxia e/ou retardo do desenvolvimento da síndrome. Métodos que utilizam biomarcadores para a identificação precoce estão avançando rapidamente.

DIANLIANG (2009) realizou uma revisão da literatura e compilou uma lista de genes candidatos que podem contribuir para o desenvolvimento da síndrome. Dentre esses genes, destacam-se aqueles que codificam as citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 e IL-10 e IL-4, que estão associados com a inflamação. Tan *et al.*, (2008) conduziram análises de bioinformática envolvendo mais de 184 genes e encontraram uma interligação entre a caquexia e os genes ADPOQ, TLR4, NF-KB e IL-6.

Em um estudo de coorte retrospectivo realizado por JOHNS *et al.*, 2017, aproximadamente 118 genes foram analisados em 1452 pacientes diagnosticados com câncer e perda de peso. Eles encontraram uma associação entre rs1799964 do gene TNF- $\alpha$  e o rs4291 do gene ECA em pacientes com baixo índice de músculo esquelético e perda de peso. Além disso, foram encontradas possíveis relações de SNPs de outros genes com

a porcentagem de perda de peso. O rs1554973 do gene TLR-4 e o rs1935949 do gene FOXO3 foram associados a uma perda de até 5% do peso. O rs4946935 do gene FOXO3 foi associado com a perda de peso de 10%, enquanto o rs42451 do gene GHRL foi associado com a perda de 15% do peso. Com base nesse trabalho, optamos por avaliar esses genes em pacientes brasileiros diagnosticados com câncer atendidos no sistema único de saúde (SUS) no Centro Oncológico de Ribeirão Preto.

### 1.3.3 Enzima conversora de angiotensina (ECA)

A enzima conversora de angiotensina (ECA) é uma proteína presente nas células do endotélio vascular, pulmões, rins e outros tecidos. Ela desempenha um papel fundamental no sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), um importante sistema regulador da pressão arterial e do equilíbrio eletrolítico (WU *et al.*, 2018).

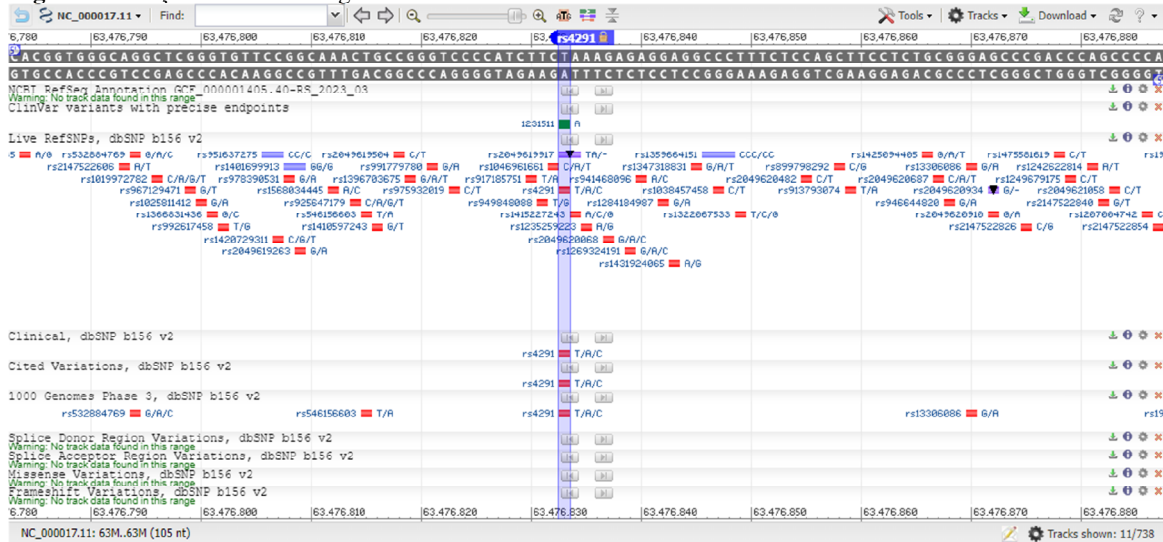
O processo de conversão da angiotensina I (AngI) em angiotensina II (AngII) é uma das principais funções da ECA. O angiotensinogenio é um peptídeo inativo produzido pelo fígado e liberado na circulação, quando encontra ECA, produzida no pulmão, essa enzima realiza a remoção do dipeptídeo e converte a AngI em Ang II (ATLAS AS, 2007).

A AngII é uma substância vasoconstritora potente, ou seja, causa contração dos vasos sanguíneos, levando a um aumento na resistência vascular. Isso resulta em um aumento da pressão arterial (GU *et al.*, 2001). Além disso, a AngII estimula a secreção de aldosterona pelas glândulas adrenais, o que leva a retenção de sódio e água pelos rins. Como resultado, o volume de sangue aumenta, contribuindo ainda mais para o aumento da pressão arterial. ECA também é responsável pela degradação de bradicinina, que é um peptídeo que promove vasodilatação, ou seja, o relaxamento dos vasos sanguíneos, e possui atividade anti-inflamatória, a degradação de bradicinina pela ECA reduz seus efeitos vasodilatadores e anti-inflamatórios (LAGHLAM *et al.*, 2021).

Devido ao seu papel central no controle da pressão arterial, a inibição de ECA vem sendo amplamente utilizada como terapia na hipertensão arterial. Os inibidores da ECA bloqueiam a sua ação, reduzindo a conversão de AngI em AngII. Isso resulta em vasodilatação, redução da resistência vascular periférica, diminuição da retenção de sódio e água, e consequentemente, a redução da pressão (ENGELI *et al.*, 2000).

O gene que codifica ECA está localizado no cromossomo 17q23.3. Woods *et al.*, (2000) relata que polimorfismo no gene do ECA tem sido associada a níveis elevados da ECA sérica e tecidual, o que resultaria em uma maior produção do vasopressor Ang II e, ao mesmo tempo, uma redução da meia vida do vaso dilatador bradicina. No caso desse gene, o polimorfismo mais estudado é a inserção/deleção de uma sequência de 287 pares de base. Brugts *et al.*, 2011, Sumukadas *et al.*, 2007 observaram que o rs4291 que ocorre no exon 17 na posição 63476833 do gene ECA (figura 7), apresenta correlação com a hipertensão e poderia modular a resposta a anti-hipertensivos, além disso estudos epidemiológicos sugeriram que o uso de inibidores de ECA atua na preservação de força e massa muscular.

**Figura 7:** Posição do rs4291 do gene ECA.



**Fonte:** Adaptado National Human Genome Research Institute.

### 1.3.4 Gene Forkhead box O (FOXO)

O gene FOXO, conhecido como “forkhead box O”, refere-se a uma família de genes que codificam fatores de transcrição pertencentes à família FOXO. Existem quatro membros principais dessa família: FOXO1, FOXO3, FOXO4 e FOXO6 (MORRIS, 2013). Esses fatores de transcrição desempenham papéis cruciais na relação de vários processos biológicos, incluindo o envelhecimento, a resposta ao estresse, a diferenciação celular, a apoptose, o metabolismo e a homeostase (MORRIS *et al.*, 2015)

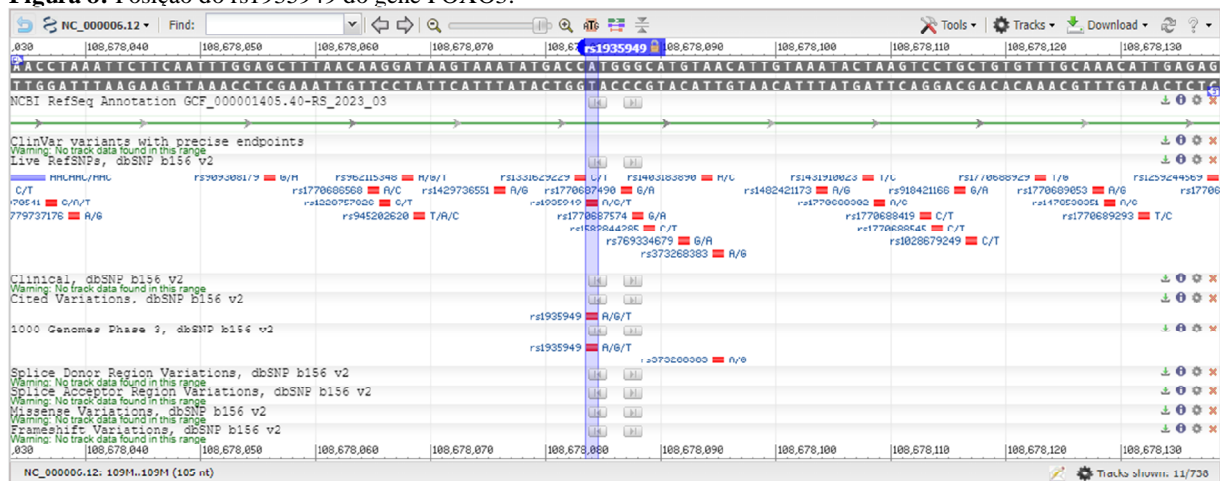
Uma das principais funções de FOXO3 é regular a expressão de genes envolvidos no metabolismo, como aqueles relacionados à glicose, lipídios e a resposta a estresse

oxidativo. Eles também desempenham um papel importante na regulação da proliferação celular, diferenciação e sobrevivência celular (WEBB; BRUNET, 2014). Alterações na atividade desse gene podem resultar em disfunções metabólicas, desequilíbrio entre proliferação e morte celular, comprometimento da capacidade do organismo de responder a estresse e manutenção da homeostase.

O FOXO3 é expresso em vários tecidos e órgãos, incluindo músculo, coração, cérebro, fígado e células troncos. Ele é regulado por diferentes vias de sinalização como do fator de crescimento semelhante a insulina (IGF) e do fator de crescimento do tipo insulina (IGF-1) (FURUYAMA *et al.*, 2002).

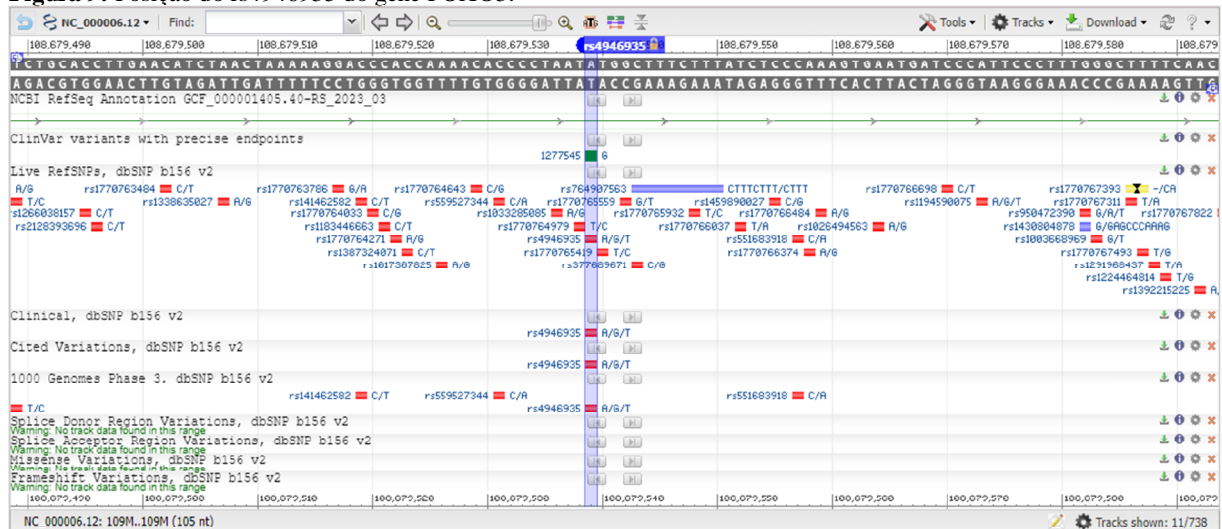
Reed *et al.*, (2012) relata que a transcrição dependente de FOXO é necessária para a atrofia das fibras musculares durante a caquexia. Os polimorfismos associados a caquexia e ao FOXO são os rs1935949, que está localizado no cromossomo 16 na posição 108678084 (figura 8), e o rs4946935, localizado no cromossomo 16 na posição 108679530 (figura 9) de acordo com os achados de Johns *et al.*, 2017.

**Figura 8:** Posição do rs1935949 do gene FOXO3.



**Fonte:** Adaptado National Human Genome Research Institute.

**Figura 9:** Posição do rs4946935 do gene FOXO3.



**Fonte:** Adaptado National Human Genome Research Institute.

### 1.3.5 Grelina (GHRL)

A grelina é um hormônio peptídico, conhecido como “hormônio da fome”, que desempenha um papel crucial na regulação do apetite, metabolismo e balanço energético do organismo. É produzida principalmente nas células endócrinas do estômago, mas também é secretada em maior quantidade por outros tecidos, como intestino, pâncreas e hipotálamo (SATO *et al.*, 2012).

A grelina também é conhecida por desempenhar um papel importante na estimulação do apetite e na regulação do comportamento alimentar. Ela age no hipotálamo, uma região do cérebro responsável pelo controle do apetite e da saciedade, ativando os neurônios orexigênicos, que estimulam a fome, e inibindo os neurônios anorexígenos, que induzem à saciedade. Assim, a grelina desempenha um papel essencial na motivação para comer e na busca por alimentos (PEREZ-TILVE *et al.*, 2011).

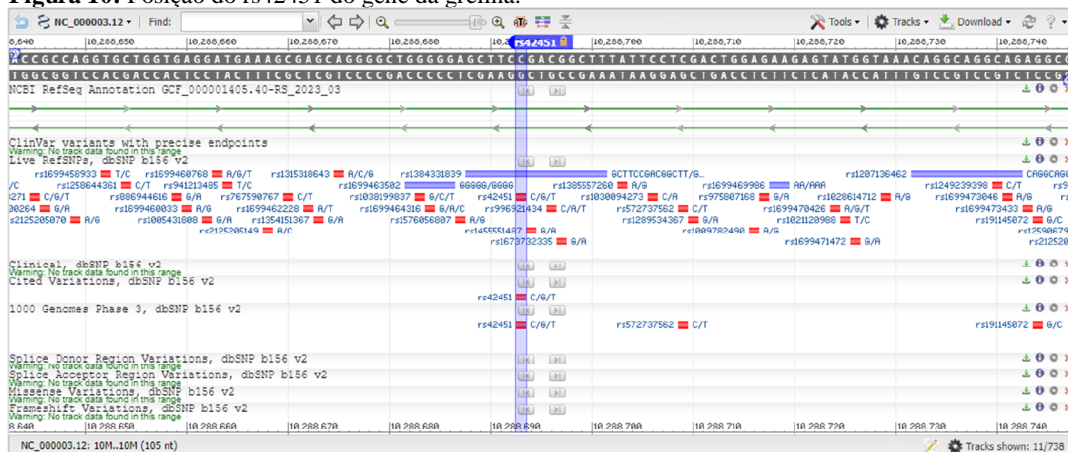
Além de seu papel na regulação do apetite, a grelina também está envolvida em outras funções metabólicas, como a liberação do hormônio de crescimento (GH), o que torna importante na regulação do crescimento e desenvolvimento do organismo. Além disso, tem efeitos sobre o metabolismo energético, promovendo a captação e armazenamento de gordura, além de estimular a produção de glicose pelo fígado (CHOI *et al.*, 2013).

Os níveis de grelina são influenciados por vários fatores, incluindo o estado nutricional, o ritmo circadiano, o estresse e a composição corporal. Por exemplo, os níveis

de grelina aumentam durante o jejum e diminuem após as refeições. Além disso, os níveis de grelina são afetados por distúrbios metabólicos, como obesidade e diabetes, bem como por condições como o câncer, doenças gastrointestinais e distúrbios alimentares (MA *et al.*, 2012).

Pacientes com caquexia não apresentam apetite, apesar de apresentarem níveis elevados de grelina. Essa elevação pode ser um mecanismo compensatório para os desequilíbrios energéticos observados nesses pacientes. Embora os mecanismos ainda não estejam totalmente esclarecidos, a grelina é secretada em resposta a perda de peso, balanço energético negativo, apetite reduzido e inflamação (BAATAR *et al.*, 2011; HANADA *et al.*, 2004; GARCIA *et al.*, 2005). Johns *et al.*, (2017) encontrou uma associação do rs42451 do gene da grelina com a perda de peso de pacientes caquéticos. O rs42451 do gene da grelina está localizado no cromossomo 3 na posição 10288693 (figura 10).

**Figura 10:** Posição do rs42451 do gene da grelina.



**Fonte:** Adaptado National Human Genome Research Institute.

### 1.3.6 Receptor do tipo Toll-like 4 (TRL-4)

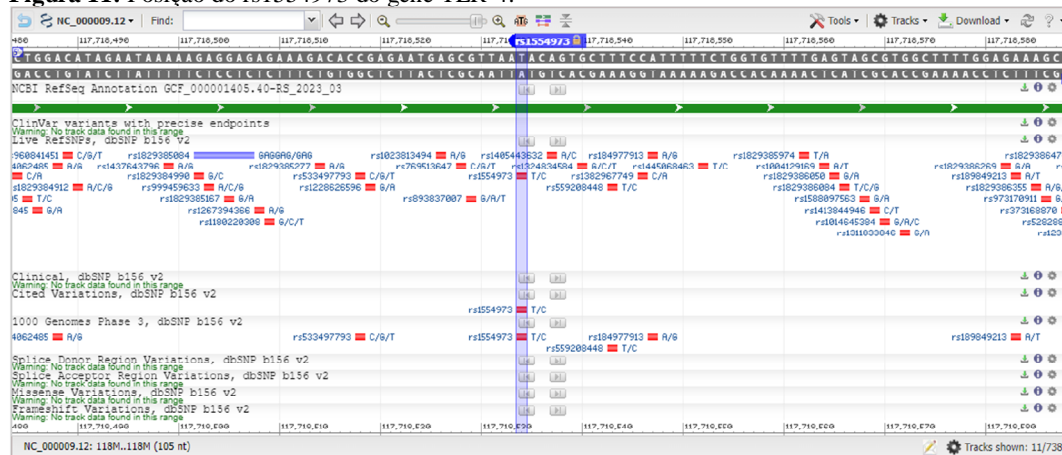
O TLR4 é uma proteína do sistema imunológico que desempenha um papel fundamental no reconhecimento de patógenos, bem como na regulação da inflamação. Além disso, faz parte da família de receptores Toll-like, que são componentes essenciais do sistema imunológico inato (MEDZHITOV *et al.*, 1997).

Esse receptor está presente em várias células do sistema imunológico, tais como macrófagos, células dendríticas e células epiteliais, sendo também expresso em outros tecidos, incluindo o musculo esquelético e o sistema nervoso central (LANG *et al.*, 2003).

Sua localização estratégica permite que o TLR4 detecte a presença de microrganismos invasores. Quando o TLR4 reconhece o patógeno, ele desencadeia uma cascata de sinalização intracelular que leva a ativação e produção de moléculas sinalizadoras como as citocinas pro-inflamatórias. Essas respostas desempenham um papel crucial na defesa do organismo (TAKEDA *et al.*, 2003)

No entanto, a ativação desregulada do TLR4 pode levar a problemas de saúde. Estudos têm demonstrado que mutações no TLR4 podem levar a um estado de inflamação crônica, associado a danos teciduais e disfunções imunológicas. As patologias que podem gerar essas desregulações são as doenças autoimunes e o câncer (ZHANG *et al.*, 2022). Além disso, o rs1554973 do gene TLR-4 localizado no cromossomo 9 na posição 1177188534 (figura 11) foi descrito no trabalho de Johns *et al.*, 2017 por apresentar associação com a perda de peso em pacientes caquéticos.

**Figura 11:** Posição do rs1554973 do gene TLR-4.



**Fonte:** Adaptado National Human Genome Research Institute.

### 1.3.7 Fator de necrose tumoral – $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )

O fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) é uma citocina com efeitos diversos em diferentes tipos de células. Ela desempenha um papel importante na regulação das respostas inflamatórias e está associado à patogênese de várias doenças inflamatórias e autoimunes (BRADLEY, 2008).

O TNF- $\alpha$  é uma proteína composta por 157 aminoácidos e é produzida principalmente por macrófagos ativados, linfócitos T e células natural killer (HORIUCHI *et al.*, 2010). Sua principal função é desencadear a liberação de diversas



#### 1.4 GDF-15, um biomarcador para a caquexia?

Descoberto há quase duas décadas, o fator de diferenciação de crescimento-15 (GDF-15), também conhecido como citocina inibitória de macrófagos (MIC-1), é uma citocina pertencente à superfamília de fatores de transformação beta atípico (TGF- $\beta$ ). É produzido em resposta ao estresse celular, incluindo a inflamação, as lesões teciduais e o câncer (WELSH, 2003).

Embora altos níveis dessa citocina sejam expressos na placenta e em condições fisiológicas de pré-natal (SIDDIQUI *et al.*, 2022), também observamos sua liberação em respostas a várias condições pró-inflamatórias, como obesidade, resistência à insulina, problemas cardíacos e câncer. O GDF-15 é expresso no músculo liso vascular, células cardíacas e endoteliais, macrófagos e adipócitos (HSU *et al.*, 2017; ADELA; BANERJEE, 2015).

Têm sido demonstrados, que em indivíduos relativamente saudáveis, os níveis de GDF-15 têm aumentado com a idade, exercícios intensos, obesidade, tabagismo, gravidez e uso de metformina (ISNARD *et al.*, 2020). Por outro lado, níveis mais altos de GDF-15 foram encontrados em situações de danos nos tecidos e estresse, resultando em uma desregulação dos circuitos neurais (MULLICAN; RANGWALA, 2018; WISCHHUSEN; MELERO; FRIDMAN, 2020).

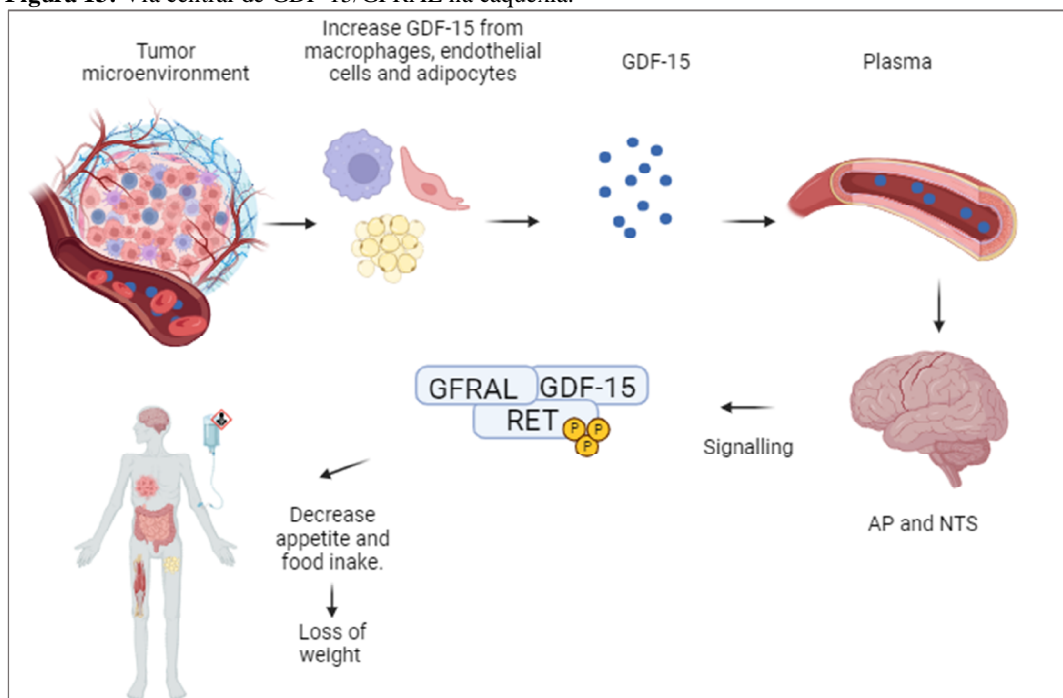
Atualmente, acredita-se que essa citocina atue nos centros de alimentação do hipotálamo e no tronco cerebral, desencadeando anorexia e levando à perda de massa magra e gorda. Isso ocorre por meio do aumento da oxidação dos lipídeos, atrofia muscular e consequente desenvolvimento da caquexia.

Após a descoberta do GDNF receptor  $\alpha$ -like (GFRAL) como o receptor de alta afinidade de GDF-15, localizado no rombencéfalo no cérebro, fora da barreira hematocefálica facilitando o acesso ao receptor, estudos têm sugerido fortemente que o complexo GDF-15/GFRAL desempenha um papel central no controle da ingestão de alimentos. Provavelmente, quando os níveis séricos de formas maduras de GDF-15 estão substancialmente elevados em doenças como o câncer, ele pode interferir em uma via fisiológica de regulação do apetite, induzindo uma síndrome de anorexia/caquexia por meio de suas ações nos neurônios do cérebro posterior (EMMERSON *et al.*, 2017; HSU *et al.*, 2017; MULLICAN *et al.*, 2017).

Os dados disponíveis que relacionam a ação do GDF-15 com as síndromes de anorexia-caquexia sugerem que ele é um alvo potencial para o tratamento dessas condições em pacientes com câncer, e pode ser útil para no tratamento da obesidade grave. A administração de GDF-15 recombinante reduziu a ingestão de alimentos, regulou o gasto de energia e promoveu a perda de peso por meio do complexo GDF-15/GFRAL (DAY *et al.*, 2019; TSAI *et al.*, 2018). Estudos em camundongos com tumores xenográficos expressando níveis elevados de GDF-15 mostraram o desenvolvimento de caquexia com perda de peso proporcional aos níveis plasmático de GDF-15 (JOHEN *et al.*, 2007).

Conforme ilustrado na figura 13, GDF-15 atua especificamente nos centros do apetite no hipotálamo e no tronco encefálico, incluindo a área postrema (AP) e o núcleo do trato solitário (NTS), onde regula o apetite. O complexo de GDF-15/GFRAL, juntamente com seu receptor de rearranjado durante a transfecção (RET), induziu a fosforilação de moléculas de sinalização intracelular, como a quinase (Erk)1/2, transformação de estirpe Ak (Akt) e fosfolipase C-gama (PLC) $\gamma$  (BREIT; TSAI; BROWN, 2017; AHMED *et al.*, 2021; TSAI *et al.*, 2014)

**Figura 13:** Via central de GDF-15/GFRAL na caquexia.



**Fonte:** Adaptado Ahmed et al., 2021.

Os níveis séricos de GDF-15 podem influenciar a resposta metabólica diante de excessos ou déficit calóricos, mas não parecem desempenhar um papel como hormônio de saciedade. Além disso, foi constatado que a expressão de GDF-15 em resposta a estresse tecidual pode levar a aversão alimentar e estresse nutricional (O'RAHILLY *et al.*, 2017). Outro estudo revelou que a administração de GDF-15 induziu aversão ao paladar condicionada por meio do GFRAL, e essa citocina provocou náusea em modelo de camundongos (PANTEL *et al.*, 2018; BORNER *et al.*).

Assim, parece que a citocina GDF-15 não atua diretamente na sensação de saciedade, mas desencadeia uma resposta de aversão alimentar, resultando em estresse nutricional. Por tanto, quando os níveis séricos das formas maduras de GDF-15 estão elevados, como ocorre em doenças como o câncer, essa citocina pode ativar uma via fisiológica de regulação do apetite para induzir uma síndrome de anorexia/caquexia por meio de suas ações nos neurônios do cérebro posterior (TSAI *et al.*, 2018).

Em fevereiro de 2021, o *Food and Drug Administration* dos EUA (FDA) concedeu à empresa Roche® o direito de comercializar um kit de imunoensaio *in vitro* para quantificação da citocina GDF-15 como diagnóstico complementar para caquexia não intencional em pacientes oncológicos. Esse evento impulsionou o crescimento exponencial dos estudos relacionados a essa citocina. Portanto, avaliamos os níveis séricos de GDF-15 em pacientes brasileiros diagnosticados com câncer e sua possível associação com os SNPs dos genes FOXO3 (rs1935949), FOXO3 (rs4946935), GHRL (rs42451), TLR4 (rs1554973), TNF-ALFA (rs1799964), ECA (rs4291), descritos no estudo de Johns *et al.* (2017).

## **2. HIPOTESE**

Os polimorfismos de único nucleotídeo dos genes FOXO3 (rs1935949), FOXO3 (rs4946935), GHRL (rs42451), TLR4 (rs1554973), TNF-ALFA (rs1799964), ECA (rs4291), e o aumento da liberação de GDF-15 no sangue de pacientes brasileiros com câncer podem ser potenciais biomarcadores de susceptibilidade ao desenvolvimento da caquexia

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar biomarcadores de susceptibilidade genética (SNPs) e de processos inflamatórios (GDF-15) no desenvolvimento da caquexia em pacientes brasileiros com câncer.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

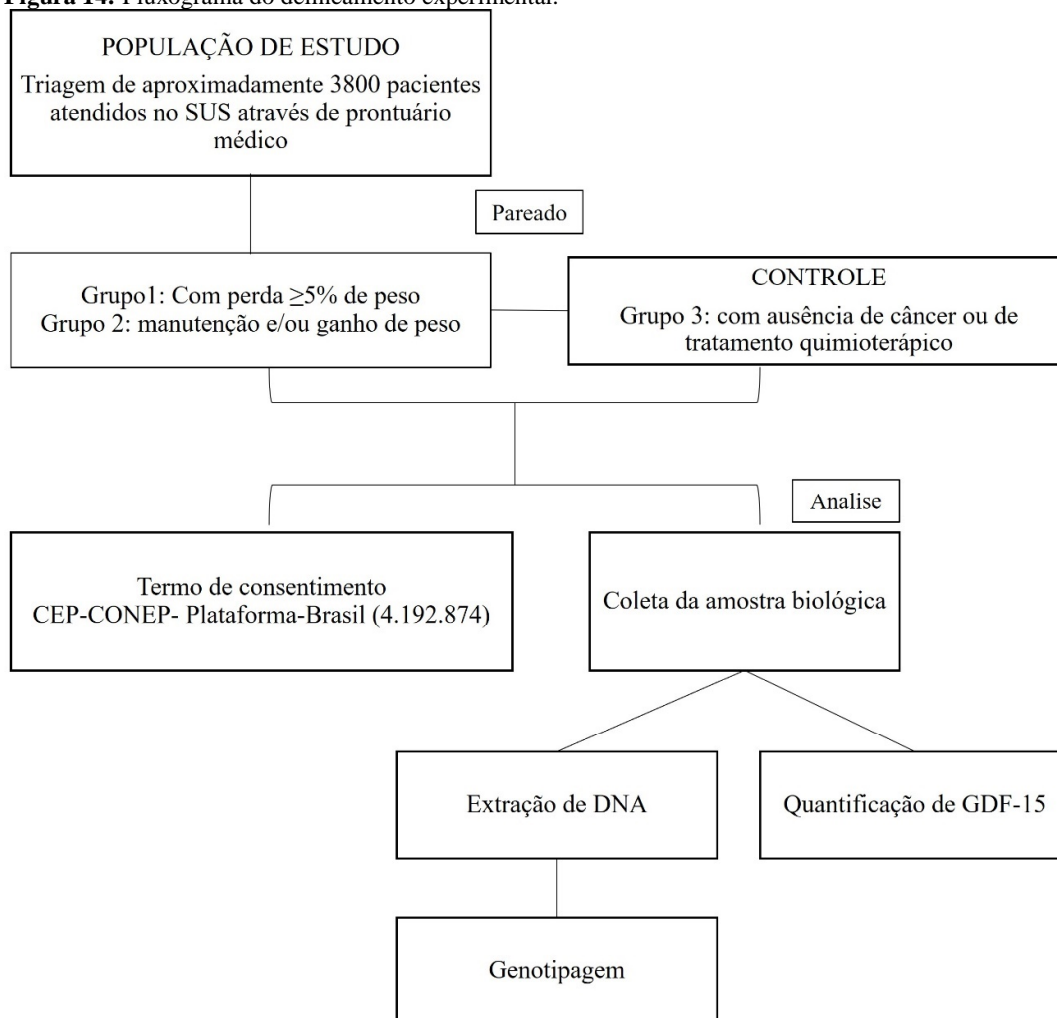
1. Selecionar pacientes oncológicos atendidos no Instituto Ribeirãopretano de Combate ao Câncer em tratamento quimioterápico com perda de peso  $\geq 5\%$ , com manutenção ou ganho de peso para genotipagem e avaliação dos níveis de GDF-15;
2. Aplicar questionários sobre a Avaliação Subjetiva Global e um Questionário de Frequência Alimentar para caracterização da amostra e correlacionar com resultados da genotipagem e dos níveis de GDF-15 dos pacientes oncológicos;
3. Genotipagem dos polimorfismos de único nucleotídeo (SNPs) dos genes: FOXO3 (rs1935949), FOXO3 (rs4946935), GHRL (rs42451), TLR4 (rs1554973), TNF-ALFA (rs1799964), ECA (rs4291) dos pacientes oncológicos selecionados e controles;
4. Coletar amostras de sangue de indivíduos com ausência de câncer para pareá-los com os pacientes oncológicos;
5. Quantificar o nível da citocina GDF-15 no soro desses pacientes oncológicos e comparar com os controles pareados com ausência de câncer;
6. Comparar os dados clínicos, antropométricos, nutricionais, genéticos, liberação de GDF-15 entre os grupos de pacientes oncológicos e controles a fim de correlacioná-los com a caquexia.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Delineamento Experimental

O estudo clínico foi realizado com pacientes acometidos com câncer, que estão em tratamento quimioterápico. Coletou-se amostras de sangue, aplicou-se de questionário alimentar, de qualidade de vida, aferições de medidas antropométricas destes pacientes e registrou-se do prontuário médico dados sobre o tipo de tumor, evolução da doença e tipo de tratamento utilizado. Em seguida procedeu-se com a extração de DNA e quantificação de GDF-15 no soro das amostras de sangue segundo o fluxograma (figura 14).

**Figura 14:** Fluxograma do delineamento experimental.



O projeto foi aprovação pelo Comitê de Ética em pesquisa CEP-CONEP-Plataforma-Brasil com Número do Parecer: 4.192.874 e 5.968.150, e a coleta dos dados foi iniciada em fevereiro de 2021. A coleta dos dados clínicos e do material biológico dos pacientes foi supervisionado pelo médico responsável pelo Instituto Ribeirãopretano de Combate ao Câncer, Prof. Dr. Adilson Aparecido Faccio (Anexo 1).

#### 4.2 Local de desenvolvimento do estudo e descrição da amostra

Embasamos o n experimental em outro trabalho populacional do grupo de pesquisa, que estudou polimorfismos presentes no gene que codifica a enzima cotecol metil transferase em pacientes com fibromialgia (BARBOSA *et al.*, 2012).

$$n = (Z_{\alpha/2} \cdot \delta \cdot E)^2$$

Onde: n – tamanho da amostra;  $Z_{\alpha/2}$  – valor crítico para o grau de confiança desejado, usualmente: 1,96 (95%);  $\delta$  – desvio padrão populacional da variável; E – erro padrão, usualmente:  $\pm 5\%$  da proporção dos casos (precisão absoluta), ou  $\pm 5\%$  da média ( $1,05 \times$  média).

De acordo com o cálculo amostral, o grupo de estudo deve conter um  $n = 76,8$  pacientes oncológicos com perda de peso. Dividimos a população em três grupos de estudos: pacientes oncológicos em tratamento quimioterápico com perda de peso  $\geq 5\%$  do centro oncológico (grupo 1); pacientes com câncer de mama com manutenção e/ou ganho de peso em tratamento quimioterápico do centro oncológico (grupo 2); controles (com ausência de câncer) coletados no laboratório de análises clínicas (LAC) -UNAERP (grupo 3), conforme a tabela 1.

**Tabela 1:** Descrição dos grupos de indivíduos para análise de citocina GDF-15 e genotipagem de SNPs.

	<b>Característica</b>	<b>Local</b>
<b>Grupo 1</b>	Com perda de peso $\geq 5\%$ em tratamento quimioterápico	Instituto de Ribeirão Pretano de Combate ao Câncer em Ribeirão Preto/SP
<b>Grupo 2</b>	Manutenção e/ou ganho de peso com câncer de mama em tratamento quimioterápico	Instituto de Ribeirão Pretano de Combate ao Câncer em Ribeirão Preto/SP
<b>Grupo 3</b>	Ausência de câncer e tratamentos oncológicos	Laboratório de Análises Clínicas UNAERP em Ribeirão Preto/SP

#### 4.2.1 Caracterização e entrevista do grupo 1

Inicialmente foi realizada uma triagem através dos dados nos prontuários médicos para selecionar os pacientes com perda de peso  $\geq 5\%$  que ocorreu em até três meses do início do tratamento quimioterápico. Após a seleção, o paciente foi abordado antes do início da sessão de quimioterapia e convidado a participar da pesquisa. Foi entregue o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (anexo 4) e realizado a leitura e esclarecimentos de todas as dúvidas dos pacientes selecionados.

Em seguida, para caracterização da amostra aplicamos um questionário estruturado para coletar informações sobre idade, escolaridade, renda familiar, tempo de diagnóstico, tabagismo, alcoolismo e comorbidades associadas.

Dados relacionados ao tratamento, estágio da doença, cirurgia, peso, altura, medicamentos e histórico do paciente foram coletados do prontuário médico. O peso e a altura foram usados para cálculo do Índice de Massa Corporal (IMC), e posteriormente classificados conforme a OMS (2000) e OPAS (2001), de acordo com a idade.

A identificação de complicações associadas ao estado nutricional dos pacientes, foi realizado através do uso do compilado de dados da Avaliação Subjetiva Global, Questionário de Frequência Alimentar (QFA) que buscam identificar desconfortos causados pelo tratamento e/ou pela doença, aceitação da dieta, consumo alimentar, escolhas alimentares e alteração na palatabilidade desses indivíduos. Para verificar a qualidade de vida dos pacientes submetidos a quimioterapia foi utilizado o instrumento QLQ-C30 (*Quality of Life Questionnaire*), validado pela Organização Europeia de Pesquisa e Tratamento do Câncer (EORTC em 1986). A versão utilizada neste trabalho foi a versão traduzida e adaptada culturalmente para a população brasileira (MARINHO et al., 2019),

Através dos questionários descritos acima compilamos as perguntas gerando o questionário utilizado no presente trabalho (ANEXO 5).

Os critérios para encerrar ou suspender a pesquisa foram: a não adesão dos indivíduos e a recusa de assinatura do TCLE). O participante da pesquisa teve a liberdade de retirar o seu consentimento e o material genético e deixar de participar do estudo, a qualquer momento, sem que isso tenha trazido prejuízo à continuidade do seu tratamento.

O grupo 1 apresentou os seguintes critérios de inclusão: adultos (acima de 18 anos) e idosos (até 90 anos), de ambos os sexos, com ou sem alterações metabólicas (tais como

diabetes, colesterol, hipertensão, diabetes mellitus tipo 1 ou 2, triglicérides, dentro outras patologias), diagnosticados com diferentes tipos de tumores com/sem radioterapia, e que apresentaram perda peso maior que 5% após o início do tratamento quimioterápico. Os critérios de perda de peso foram utilizados de acordo com o diagnóstico da caquexia baseado no critério desenvolvido pelo Consenso Brasileiro de Caquexia (figura 1).

E os critérios de exclusão grupo 1 foram: idade inferior a 18 anos e acima de 90 anos, ausência de câncer, ausência de terapia quimioterápica no momento do recrutamento, ausência de perda de peso nos últimos seis meses, ausência de exames bioquímicos, presença de HIV e doenças autoimunes e ausência de histórico médico.

#### 4.2.2 Caracterização do grupo 2

A triagem foi realizada através de consultas dos prontuários médicos onde buscamos identificar pacientes oncológicos com ganho e/ou manutenção do peso após o início do tratamento quimioterápico. Após essa triagem, o paciente foi abordado antes do início da sessão de quimioterapia e convidado a participar da pesquisa, onde seguimos com os mesmos critérios que antecedem a coleta de material biológico descritos no item 4.2.1.

Para melhor caracterização dessa população estudo registramos as seguintes informações: idade, etnia, tempo de diagnóstico, comorbidades associadas, estágio da doença, peso, altura medicamentos e histórico do paciente, sendo coletados do prontuário médico. O peso e a altura foram usados para cálculo do Índice de Massa Corporal (IMC), e posteriormente classificados conforme a OMS (2000) e OPAS (2001), de acordo com a idade.

Os critérios de inclusão para o grupo 2 foram: mulheres (acima de 18 anos) e idosas (até 90 anos) com câncer de mama, de sexo feminino, com ou sem alterações metabólicas (tais como diabetes, colesterol, hipertensão, diabetes mellitus tipo 1 ou 2, triglicérides, dentro outras patologias), que já iniciaram o tratamento quimioterápico com/sem radioterápico, e que apresentaram ganho e/ou manutenção de peso durante o tratamento. E os critérios de exclusão foram: idade inferior a 18 anos e acima de 90 anos, diagnóstico de outros tipos de tumores, ausência de câncer, ausência de terapia quimioterápica no momento do recrutamento, perda de peso nos últimos seis meses, ausência de exames bioquímicos, presença de HIV e doenças autoimunes e ausência de histórico médico.

### 4.2.3 Controles

As amostras do grupo 3 foram coletadas no Laboratório de Análises Clínicas (LAC) do Curso de Ciências Farmacêuticas da Universidade de Ribeirão Preto mediante a autorização da Coordenadora do LAC Carla Denipotte Gallon Pitta (Anexo 2), onde os dados dos controles foram pareados com os dados coletados dos pacientes do instituto oncológico.

Após triagem para pareamento, os indivíduos foram abordados e convidados a participar da pesquisa, seguido da leitura do termo os participantes assinaram o TCLE (anexo 3), permitindo a coleta de 5mL.

Os critérios de inclusão foram baseados nos itens de pareamento dos pacientes atendidos no centro oncológico tais como: sexo, idade e etnia. E os critérios de exclusão da amostra controles foram: indivíduos com idade inferior a 18 anos e acima de 90 anos, indivíduos com histórico de câncer, sem exames bioquímicos e que possuem ausência de histórico médico.

## 4.5 Coleta de sangue

Foram coletados 5ml de sangue periférico em tubos BD Vacutainer (K2 EDTA (K2E) 7.2 mg Plus Blood Collection Tubes). As amostras de sangue foram processadas no Laboratório de Biologia Molecular da Unidade de Biotecnologia da UNAERP, autorizado pela coordenadora da Unidade de Biotecnologia Profa. Suzelei de Castro França (Anexo 6).

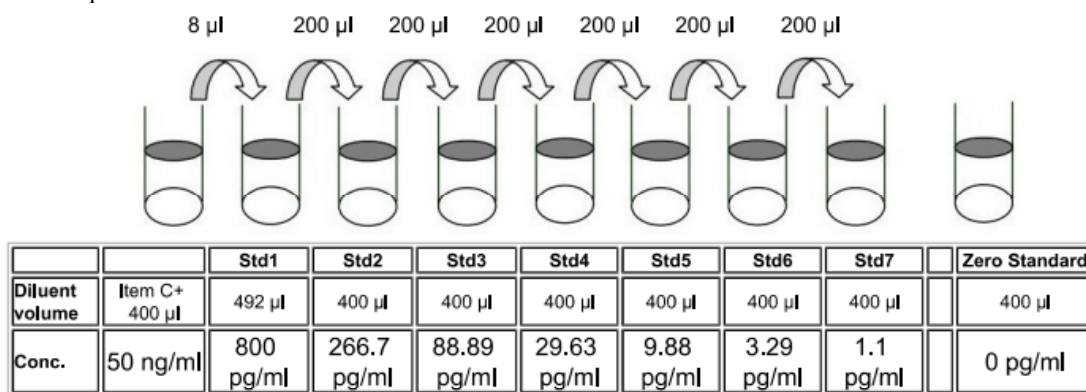
O transporte dos tubos das amostras de sangue foi devidamente etiquetado e realizado em caixa térmica adequada para transporte contendo gelo reciclável pôr no máximo 1 hora. O transporte das amostras de sangue foi baseado nos requisitos definidos pela Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) 20/2014 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) e pela Portaria Conjunta Ministério da Saúde (MS)/Anvisa 370/2014, que trata exclusivamente do transporte de sangue e componentes no âmbito da hemoterapia. O material foi armazenado em freezer -20C para extração de DNA e quantificação da interleucina GDF-15.

#### 4.6 Quantificação de GDF-15

A liberação da citocina GDF-15 foi quantificada através do plasma das amostras de sangue obtidas dos pacientes e controles utilizando-se o kit ELISA human GDF-15/MIC-1 (Sigma). A quantificação foi realizada em duplicata conforme recomendações do fabricante.

Inicialmente centrifugou-se o sangue a 2000G por 5 minutos, separando o plasma, e em seguida foi armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Primeiramente os reagentes foram mantidos em temperaturas ambiente ( $18-25^{\circ}\text{C}$ ), e após o descongelamento do plasma foi realizada a diluição 5x em diluente e do Standart (padrão) ( $50\text{pg/mL}-800\text{pg/mL}$ ) conforme a figura 15.

**Figura 15:** Diluição do anticorpo Standart (padrão) para avaliação e comparação dos níveis de GDF-15 do soro dos pacientes.



Fonte: Adaptado do protocolo kit ELISA human GDF-15/MIC-1 (Sigma).

Em placa de 96 poços, adicionou-se 100ul de cada diluição do Standart (padrão) e 50ul do plasma dos pacientes, incubou-se por 2h30min em temperatura ambiente e procedeu-se com a lavagem dos poços com *Wash Buffer*. Foi adicionado 100uL do anticorpo de detecção e aguardou-se 1h em agitação e temperatura ambiente. Procedeu-se novamente com a lavagem. Foi adicionado 100uL de *streptavidin* e novamente houve a placa foi incubada em temperatura ambiente por 45 min.

A lavagem foi novamente realizada, e foi adicionado 100uL de TMB, e novamente foi encubado por 30min em temperatura ambiente. Para finalizar foi adicionado 50uL de *Stop Solution* e a leitura da placa foi realizada em um leitor universal de microplacas (Multiskan FC Thermo scientific) no comprimento de onda de 450nm.

#### 4.7 Extração de DNA do sangue total

A extração de DNA foi realizada a partir de 200 µl das amostras de sangue periférico utilizando o método da coluna com Kit ilustra Blood Genomic Prep Mini Spin (GE Healthcare), seguindo as instruções do fabricante.

Em um tubo de 1,5mL foram adicionados 20uL de proteinase K, 200uL de amostra de sangue total e 400uL de *Lysis Buffer type 10*. Em seguida, foi levado ao vórtex por 15 seg e os tubos foram acomodados em temperatura ambiente por 10 min. O conteúdo foi transferido para a coluna com tubo coletor presente no kit e centrifugou-se por 1 minuto há 11000G.

Descartou-se o resíduo do tubo coletor e foi adicionado na coluna 500uL *Lysis Buffer type 10*, centrifugou-se novamente por 1 minuto há 11000G. Foi descartado o conteúdo presente no tubo coletor e em seguida adicionou-se 500uL de *Wash Buffer type 6* e centrifugou-se por 3 minutos há 11000G.

Por fim procedeu-se com a troca do tubo coletor por um tubo novo e foram adicionados 200uL do *Elution Buffer type 5* pré-aquecido (70°C) em banho maria. Novamente houve a centrifugação por 1 min há 11000G para coleta do material genético. Posteriormente, foi realizada a avaliação espectrofotométrica da concentração e qualidade das amostras de DNA em aparelho nanofotômetro (IMPLAN).

#### 4.8 Genotipagem dos Polimorfismos de único nucleotídeo (SNPs)

A genotipagem foi realizada pelo método Real-Time PCR, que é comumente utilizado tanto em pesquisas científicas quanto em diagnósticos genéticos de rotina e as sondas necessárias estão disponíveis comercialmente.

A reação de genotipagem foi realizada em colaboração com o Dr Dante Gavio, proprietário da empresa de testes genéticos DGLab®, localizada na Supera Parque.

Para o teste foi utilizado o kit Genotyping Master Mix® e sondas TaqMan® (Thermo) para os genes: FOXO3 (rs1935949), FOXO3 (rs4946935), GHRL (rs 2451), TLR4 (rs1554973), TNF-ALFA (rs1799964), ECA (rs4291) (JOHNS et al., 2016; SCHLEINITZ; DISTEFANO; KOVACS, 2010).

A reação foi realizada em um volume final de 10 µL em placas de 96 poços e a cada mistura de reação no poço continha 5µL de Taqman Genotyping Master Mix®, 0,5

$\mu\text{L}$  de ensaio Taqman SNP® (20 $\times$ ) e 4,5  $\mu\text{L}$  de água DNA-free e DNA diluído a 0,2 ng/ $\mu\text{L}$  foram adicionados, conforme demonstrado na tabela 2.

**Tabela 2:** Concentrações de reagentes para a reação de PCR em tempo real.

<b>Componente</b>	<b>Volume</b>
Taqman Genotyping Master Mix	5uL
Taqman SNP (20 $\times$ )	0,5uL
água livre de DNA	4,5uL

As condições de ciclagem térmica consistiram em ativação enzimática a 95°C, 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 s e hibridização a 60°C por 1 min, conforme a tabela 3. Todos os ensaios foram realizados em triplicada por sistema de PCR em tempo real Quantstudio 6 flex® (thermofisher) e os resultados de genotipagem foram analisados através do programa appliedbiosystems® (thermofisher).

**Tabela 3:** Parâmetros de ciclagem para a reação.

<b>Passo</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Duração</b>	<b>Ciclo</b>
Ativação enzimática	95	10 min	HOLD
Desnaturação	95	15 seg	40
Anelacão/extensão	60	1 min	

#### 4.9 Análise dos dados

Para a análise estatística, utilizamos o software GraphPad Prism v. 9.0 e consideramos situações como estatisticamente significativas quando o valor de p foi inferior a 0,05.

Quanto à avaliação dos pesos iniciais (antes do diagnóstico), finais (após o início do tratamento/data da coleta) e o GDF-15, primeiramente realizamos a avaliação da normalidade dos dados. Isso se deve ao fato de que os principais métodos estatísticos utilizados na análise de dados clínicos e experimentais se baseiam em modelos teóricos que pressupõem uma distribuição normal, como o teste t de Student, ANOVA, coeficiente de Pearson, regressão linear (resíduos) e análise discriminante (MIOT, 2017).

Entretanto, eventos naturais representados por dados contínuos podem seguir várias distribuições de frequência, dentre elas a distribuição em forma de sino conhecida

como curva normal ou Gaussiana. Logo, a avaliação da normalidade da distribuição dos dados desempenha um papel crucial na descrição apropriada da amostra e na análise inferencial (MIOT, 2017).

Posteriormente, uma vez constatada a anormalidade na distribuição dos dados, procedemos às análises de comparação do GDF-15 entre os grupos mencionados na Tabela 1. Para isso, utilizamos o teste Kruskal-Wallis ou o teste Mann-Whitney para dados com distribuição não normal, e quando os dados apresentaram normalidade, aplicamos o teste ANOVA ou o teste t de Student.

No que se refere às análises dos SNPs, empregamos o teste qui-quadrado ( $\chi^2$ ) para determinar a existência de associação entre duas variações categóricas. Ou seja, verificamos se houve uma frequência maior do alelo de risco no grupo 1, com um nível de significância de 0,05. Para avaliar a frequência dos SNPs entre o grupo 1 e o grupo 2, utilizamos o teste de Fisher, uma alternativa ao teste  $\chi^2$ , que busca determinar a significância de uma associação entre duas variáveis categóricas.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Características gerais dos pacientes do grupo 1

Na tabela 4, encontram-se as características distintivas de cada grupo de estudo. Após a triagem de aproximadamente 3800 prontuários médicos, selecionamos um grupo de 90 pacientes que apresentaram uma perda de peso igual ou superior a 5% em três meses de tratamento quimioterápico, abrangendo diferentes tipos de tumores; este grupo foi designado como grupo 1 (tabela 4).

Paralelamente, foram selecionados 29 indivíduos com ganho/manutenção de peso em tratamento quimioterápico (grupo 2), para nossa surpresa, todos esses pacientes apresentaram câncer de mama e finalmente foram selecionados e pareados 67 indivíduos sem histórico de câncer que foram alocados no grupo controle (grupo 3).

**Tabela 4:** n selecionado para cada grupo de estudo.

	<b>Característica</b>	<b>Local</b>
Grupo 1 (n=90)	Com perda de peso $\geq 5\%$ em três meses e em tratamento quimioterápico	Instituto de Ribeirão Preto de Combate ao Câncer em Ribeirão Preto/SP
Grupo 2 (n=29)	Manutenção e/ou ganho de peso em tratamento quimioterápico (pacientes com câncer de mama)	Instituto de Ribeirão Preto de Combate ao Câncer em Ribeirão Preto/SP
Grupo 3 (n=67)	Com ausência de câncer e tratamentos oncológicos	Laboratório de Análises Clínicas UNAERP em Ribeirão Preto/SP

A idade média dos pacientes do grupo 1 foi de  $63,5 \pm 11,6$  anos (média  $\pm$  desvio padrão), com 54 (60%) dos participantes sendo do sexo masculino e 36 (40%) do sexo feminino, conforme exposto na Tabela 5.

**Tabela 5:** Características dos pacientes do grupo 1 (n=90) coletados para o estudo.

<b>Número total de pacientes (n=90)</b>	<b>Pacientes com câncer e perda de peso <math>\geq</math> 5%</b>
Idade (anos)	63,5 $\pm$ 11,6
Masculino	54 (60%)
Feminino	36 (40%)

Os tipos de tumores foram separados através de área de acometimento sendo 52 (57,8%) gastrointestinais, 16 (17,8%) de cabeça e pescoço e 13 (14,4%) de mama, como observado na tabela 6.

**Tabela 6:** Tipos de tumores divididos por localização de acometimento (n=90) do grupo 1.

Gastrointestinal	54 (57,8%)
Cabeça e pescoço	16 (17,8%)
Mama	13 (14,4)
Sistema reprodutor masculino	3 (3,3%)
Pâncreas	2 (2,2%)
Sistema Reprodutor feminino	2 (2,2%)
Pele	2 (2,2%)
Pulmão	1 (1,1%)

Adicionalmente, avaliou-se que 38 (42,2%) dos pacientes selecionados manifestaram metástases. Sendo que 21 (40,4%) dos pacientes com câncer gastrointestinal, 7 (43,7%) dos pacientes com câncer de cabeça e pescoço e 3 (23,1%) dos pacientes com câncer de mama apresentaram metástases. As regiões predominantemente afetadas foram pulmões, fígado e ossos.

Em relação aos tratamentos, observamos que 30 (36,14%) dos pacientes realizavam o tratamento com MFLOX, seguido por cisplatina com 11 (13,25%), como mostrado na Tabela 7.

**Tabela 7:** Tipos de tratamentos dos pacientes coletados (n=90) do grupo 1.

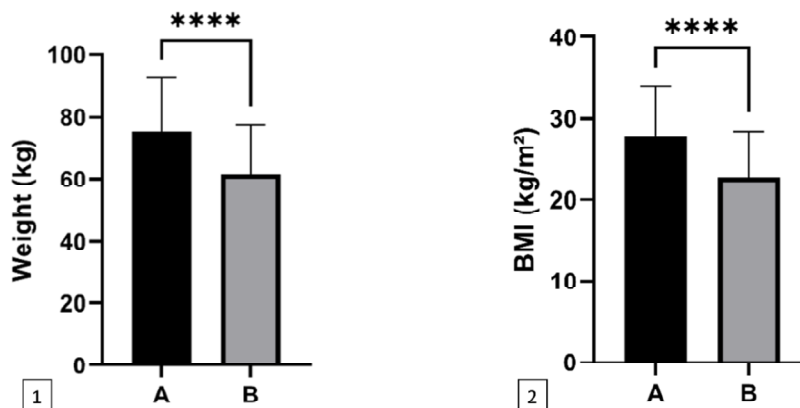
mFLOX (Oxaplatina, 5-Fluouracil e ácido Folinico)	32,2% (n=29)
Cisplatina	13,3% (n=12)
FOLFOX (Oxaliplatina, 5-Fluouracil e Leucovorin)	4,4% (n=4)
Leucovorin + 5-Fluouracil (Mayo Clinic)	7,8% (n=7)

Ciclofosfamida + Doxorrubicina	3,3% (n=3)
Carboplatina + Paclitaxel	3,3% (n=3)
Paclitaxel	2,2% (n=2)
Carboplatina + Taxol	2,2% (n=2)
CHOP (Ciclofosfamida, Rituximabe, Doxorrubicina, Oncovin e Predsona)	1,1% (n=1)
Docetaxel	1,1% (n=1)
Paclitaxel + Pamidronatado	1,1% (n=1)
Taxol + Herceptin	1,1% (n=1)
Carboplatina + Taxol	1,1% (n=1)
Carboplatina + Etoposídeo	1,1% (n=1)
Carboplatina + Cisplatina + Paclitaxel	1,1% (n=1)
FOLFOINOX (Ácido fólico, Fluorouracila, Irinotecano e Oxaplatina)	1,1% (n=1)
Cisplatina + Carboplatina + Paclitaxel + Taxol	1,1% (n=1)
Carboplatina + Paclitaxel + Taxol	1,1% (n=1)
FOLFORI (5-Fluouracil, Irinotecano e Oxalapatina)	1,1% (n=1)
Taxol	1,1% (n=1)
Cisplatina + Gencitabina	1,1% (n=1)
Gencitabina	1,1% (n=1)

## 5.2 Perda ponderal de peso dos pacientes do grupo 1

A média do peso antes do diagnóstico e após o início do tratamento quimioterápico foi observada e verificou-se uma perda significativa de peso, conforme a figura 16.1. A média do tempo de perda de peso variou entre 3 a 12 meses. Em relação a do IMC, também foi observada uma redução significativa entre os pacientes antes do diagnóstico (peso habitual) e depois do início do tratamento (figura 16.2).

**Figura 16:** Média do peso (Kg) (1) e do IMC (Kg/m<sup>2</sup>) (2) do grupo 1 antes e após o diagnóstico oncológico (n=90). Teste T onde \*\*\*\*p<0,0005.



Na tabela 9, constatou-se que antes do diagnóstico cerca de 25 (30,12%) dos pacientes apresentavam eutrofia, seguido 18 (21,68%) obesidade e 14 (16,86%) sobrepeso. No entanto, após iniciar o tratamento quimioterápico ocorreu a mudança da classificação do estado nutricional onde 35 (42,16%) apresentaram magreza, 18 (21,68%) eutrofia e 11 (13,25%) sobrepeso.

**Tabela 9:** Classificação do estado nutricional de acordo com a OMS (2000) e OPAS (2001) dos pacientes (n=90) do grupo 1, sendo o inicial o peso antes do diagnóstico e o final o peso após o tratamento (início do tratamento/data da coleta).

Classificação de acordo com IMC (kg/m <sup>2</sup> )	Peso Inicial	Peso Final
<b>Número total de pacientes (n=90)</b>		
Magreza	12 (14,45%)	35 (42,16%)
Eutrofia	25 (30,12%)	18 (21,68%)
Sobrepeso	14 (16,86%)	11 (13,25%)
Obesidade	18 (21,68%)	10 (12,04%)
Obesidade grau II	5 (6,02%)	2 (2,4%)
Obesidade grau III	2 (2,4%)	-

### 5.3 Sinais e sintomas relatados pelo grupo 1

A tabela 10 apresenta uma descrição dos sinais e sintomas relatados pelo grupo 1 (n=90). Os sinais e sintomas relatados durante o tratamento quimioterápico foram: 50 (60,24%) referem sentir cansaço, 36 (43,37%) náuseas e 32 (38,55%) dor. Estes três sintomas emergem como os mais comumente relatados dentro do grupo de estudo.

Além disso, outros sintomas, como boca seca, anorexia, dificuldades para engolir, constipação ou diarreia, sensibilidade a odores, sensação de gosto estranho na boca, entre outros, também foram mencionados.

**Tabela 10:** Sinais e sintomas relatados pelo grupo 1 (com perda de peso  $\geq 5\%$ ) durante o tratamento ou após o diagnóstico médico (n=90).

<b>Sinais e sintomas</b>	<b>Pacientes com câncer e perda de peso <math>\geq 5\%</math></b>
<b>Número total de pacientes (n=90)</b>	
Cansaço	50 (60,24%)
Náusea	36 (43,37%)
Dor	32 (38,55%)
Boca seca	28 (33,73%)
Anorexia	26 (31,32%)
Problemas para engolir	24 (28,91%)
Constipação	23 (27,71%)
Diarreia	22 (26,5%)
Cheiros que enjoam	22 (26,5%)
Alimentos com gosto estranho na boca	22 (26,5%)
Vômito	21 (25,3%)
Fraqueza	20 (24,09%)
Feridas na boca	5 (6,02%)
Redução do apetite	4 (4,81%)
Saciedade precoce	4 (4,81%)
Salivação excessiva	3 (3,61%)
Tontura	2 (2,4%)
Edema e ascite	2 (2,4%)
Sede	1 (1,2%)
Alopecia	1 (1,2%)
Pirose	1 (1,2%)
Fezes com sangue	1 (1,2%)
Não sente cheiro	1 (1,2%)
Perda do paladar	1 (1,2%)

#### 5.4 Características gerais dos pacientes do grupo 2

A formação do grupo 2 foi derivada da observação durante a coleta de pacientes, identificamos que alguns pacientes ao invés de perder peso, apresentavam ganho de peso durante o tratamento oncológico. Com base nisso, decidimos incluir esse grupo para investigar possíveis distinções nos perfis de GDF-15 e nos polimorfismos genéticos entre os pacientes que perderam peso e aqueles que mantiveram ou ganharam peso ao longo do tratamento. Coletou-se aproximadamente vinte e nove pacientes do sexo feminino com manutenção e/ou ganho de peso e todos foram diagnosticados com câncer de mama.

A tabela 11 apresenta as características dos pacientes do grupo 2, em relação da idade, peso no dia da coleta e o ganho de peso até o momento da coleta.

**Tabela 11:** Caracterização dos pacientes do grupo 2 (n=29).

<b>Número de pacientes (n=29)</b>	<b>Pacientes com câncer de mama e ganho de peso</b>
Idade (anos)	54 ± 13,5
Média do Peso (kg)	74,9 ± 17,7
Média do ganho de peso (kg)	2 ± 2,1

Na tabela 12, é possível examinar os subtipos de câncer de mama e os tratamentos associados a essas pacientes. Observou-se que aproximadamente 10 (34,5%) apresentam câncer de mama triplo negativo, enquanto 11 (37,9%) estão sob tratamento com uma combinação de duas drogas: doxorrubicina e ciclofosfamida.

Verificou-se a classificação do estado nutricional das pacientes do grupo 2 e encontrou-se que 15 (51,7%) são enquadradas como obesa, enquanto somente 6 (20,6%) são classificadas como eutróficas (tabela 13).

**Tabela 12:** Caracterização dos pacientes do grupo 2 (n=29).

<b>Número de pacientes (n=29)</b>	<b>Pacientes com câncer de mama e ganho de peso</b>
<b>Tipo de câncer de mama</b>	
Mama Triplo Negativo	10 (34,5%)
Mama Invasivo	1 (3,4%)
Mama Luminal A	5 (13,8%)
Mama Luminal B	4 (27,6%)
Mama Luminal Híbrido	9 (10,3%)

Mama HER2	2 (6,9%)
Carcinoma ducto lobular luminal A	1 (3,4%)
<b>Tipo de tratamento</b>	
Paclitaxel	5 (17,2%)
Paclitaxel + Pamidronato	3 (10,3%)
Doxorrubicina + Ciclofosfamida	11 (37,9%)
Doxorrubicina + Ciclofosfamida + Paclitaxel	1 (3,4%)
Ciclofosfamida + Paclitaxel	2 (6,9%)
Taxol	7 (24,1%)

**Tabela 13:** Classificação do estado nutricional de acordo com a OMS (2000) e OPAS (2001) dos pacientes do grupo 2 (n=29), sendo o final o peso registrado através do prontuário no dia da coleta.

<b>Classificação de acordo com IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>	<b>Peso Final</b>
<b>Número total de pacientes (n=29)</b>	
Magreza	-
Eutrofia	6 (20,6%)
Sobrepeso	8 (27,6%)
Obesidade	15 (51,7%)

#### 5.4 Quantificação dos níveis circulantes de GDF-15 na perda de peso

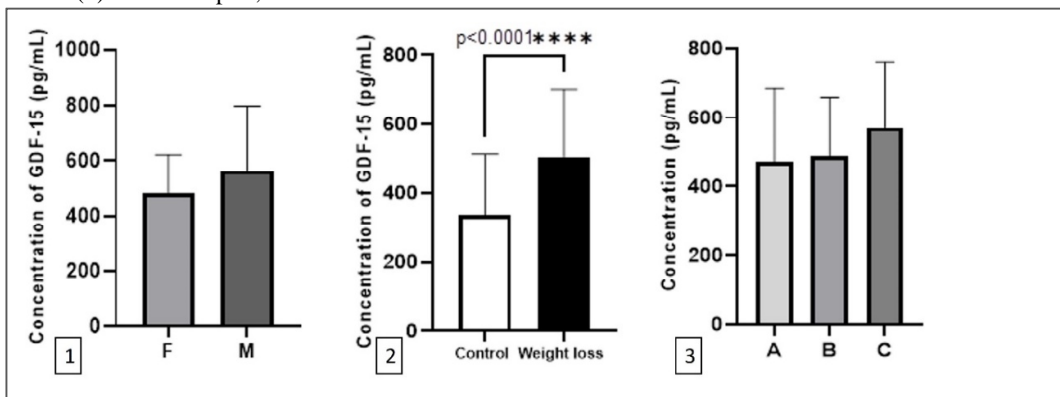
Realizou-se uma análise para investigar possíveis diferenças nos níveis circulantes de GDF-15 entre homens e mulheres do grupo 1. Entretanto, observamos que os pacientes do grupo 1 não apresentaram variações nos níveis circulantes de GDF-15 entre os gêneros (figura 17.1), sendo assim continuamos a análise considerando todos os pacientes de forma conjunta, sem distinção de sexo.

Observamos na figura 17.2 que a média dos níveis de GDF-15 do grupo 1 (n=83) foi significativamente maior quando comparado ao grupo 3 (n=67). Dessa forma, analisou-se a relação da concentração de GDF-15 com o grau de perda de peso do grupo 1 na figura 15.3 e identificamos que de acordo com o grau de perda de peso os níveis de GDF-15 foram aumentando.

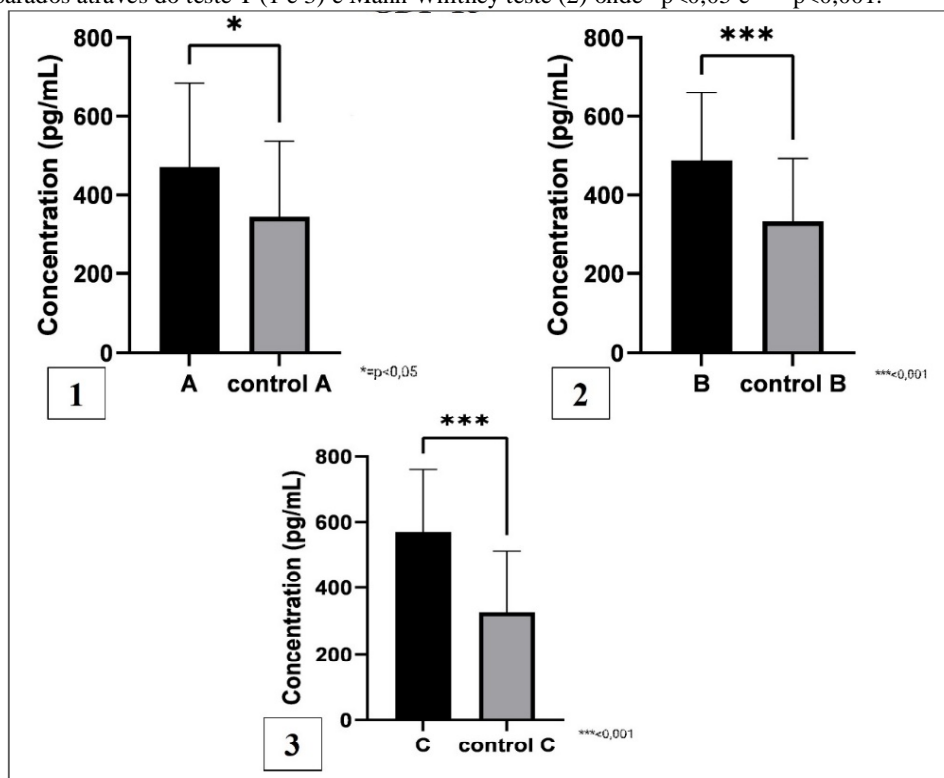
Após identificar as diferenças entre as concentrações dos níveis séricos de GDF-15 entre o grupo 1 e o grau de perda de peso, os níveis de GDF-15 foram subdivididos pela perda peso (figura 18). Através dessas análises verificamos uma diferença

significativa entre o controle e o paciente, além de visualizar uma tendência do aumento dos níveis de GDF-15 de acordo com a maior perda de peso.

**Figura 17:** (1) Níveis de GDF-15 quantificados de soro de pacientes do grupo 1 (n=83) subdivididos pelo sexo, onde “F” corresponde ao sexo feminino e “M” ao sexo masculino. (2) Níveis de GDF-15 do soro de pacientes grupo 1 (n=83) x grupo 3 (n=67). Níveis de GDF-15 de acordo com a perda de peso do grupo 1, sendo de 4-9kg (A), 10-19kg (B) e mais de 20kg (C) (3). Os valores foram expressos em pg/mL após cálculo da média dos níveis dos pacientes e controle sendo comparados através do Mann Whitney teste (1 e 2) e ANOVA (3) onde \*\*\*\*p<0,0001.



**Figura 18:** Níveis de GDF-15 quantificados de soro de pacientes do grupo 1 (n=83) subdivididos pela perda peso sendo: 4-9kg (A), 10-19kg (B) e mais de 20kg (C) comparado com o seu respectivo controle. Os valores foram expressos em pg/mL após cálculo da média dos níveis dos pacientes e controle sendo comparados através do teste T (1 e 3) e Mann Whitney teste (2) onde \*p<0,05 e \*\*\*p<0,001.

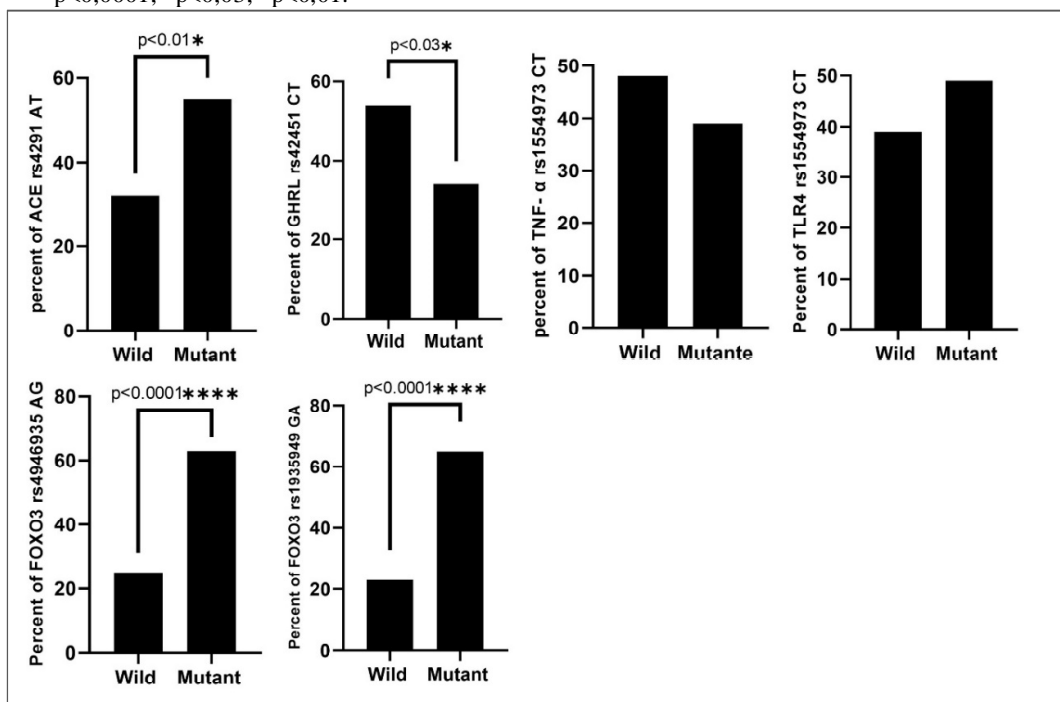


## 5.5 Polimorfismos Genéticos relacionados com a perda de peso

Inicialmente, analisou-se a frequência dos SNPs entre o grupo 1 (n=90) e o grupo 3 (n=67), no entanto não houve diferença estatística entre eles (dados não mostrados).

Dessa forma, e como descrito na literatura científica (SUN *et al.*, 2010) avaliarmos a ocorrência dos alelos de riscos dos SNPs entre os pacientes do grupo 1 (pacientes oncológicos com perda de  $\geq 5\%$ ). Na figura 19 observamos que os alelos de risco do rs4946935 (FOXO3), rs193549 (FOXO3) e rs4291 (ECA) apresentam diferenças significativas, demonstrando a ocorrência desses SNPs entre os pacientes do grupo 1. Já para o rs42451 (GHRL) foi visto a presença estatisticamente positiva do alelo selvagem, para o rs1554973 (TLR4) e rs1799964 (TNF- $\alpha$ ) não foram observadas diferenças significativas entre os pacientes do grupo 1.

**Figura 19:** Polimorfismos rs4291 (ECA), rs42451 (GHRL), rs4946935 (FOXO3), rs193549 (FOXO3), rs1799964 (TNF-alfa) e rs1554973 (TLR4) analisados nos pacientes do grupo 1 (n=90). Teste  $\chi^2$  onde \*\*\*\*p<0,0001; \*p<0,03; \*p<0,01.



## 5.6 Análise comparativa dos dados

Com o intuito de avaliar as relações entre os dados dos pacientes e os resultados experimentais, conduziu-se análises comparativas. Investigou-se as possíveis associações

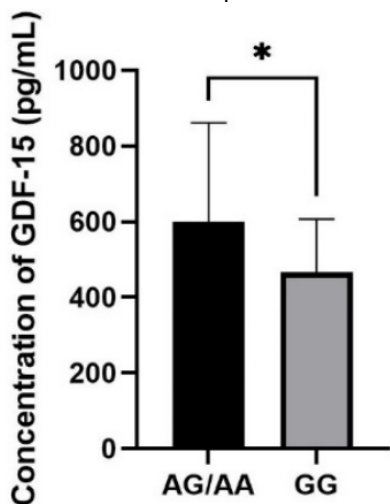
do GDF-15 com o sexo, o alelo de risco no grupo 1 (com perda de peso  $\geq 5\%$ ), a comparação entre o grupo 1 e o grupo 3 (controle), bem como os sintomas e sinais relatados pelos pacientes. Além disso, examinamos a frequência dos SNPs em relação ao sexo, aos sintomas e sinais, e de acordo com o IMC dos pacientes.

### 5.6.1 GDF-15 e as possíveis associações com os pacientes

Realizou-se uma análise para investigar possíveis diferenças nos níveis circulantes de GDF-15 entre homens e mulheres do grupo 1. Entretanto, observamos que os pacientes do grupo 1 não apresentaram variações nos níveis circulantes de GDF-15 entre os gêneros (figura 17.1), sendo assim continuamos a análise considerando todos os pacientes de forma conjunta, sem distinção de sexo.

Em relação aos SNPs, identificamos uma correlação positiva entre os níveis de GDF-15 e o rs4946935 do gene FOXO3, conforme evidenciado na figura 20. Enquanto os outros SNPs não apresentaram relação estatística entre a frequência do alelo de risco com os níveis circulantes de GDF-15.

**Figura 20:** Níveis de GDF-15 quantificados de soro de pacientes do grupo 1 (n=83) subdivididos pela presença do alelo de risco do gene FOXO3 (rs4946935). Os valores são expressos em pg/mL após cálculo da média dos níveis dos pacientes sendo comparados através do teste Mann Whitney onde  $*p < 0.04$ .

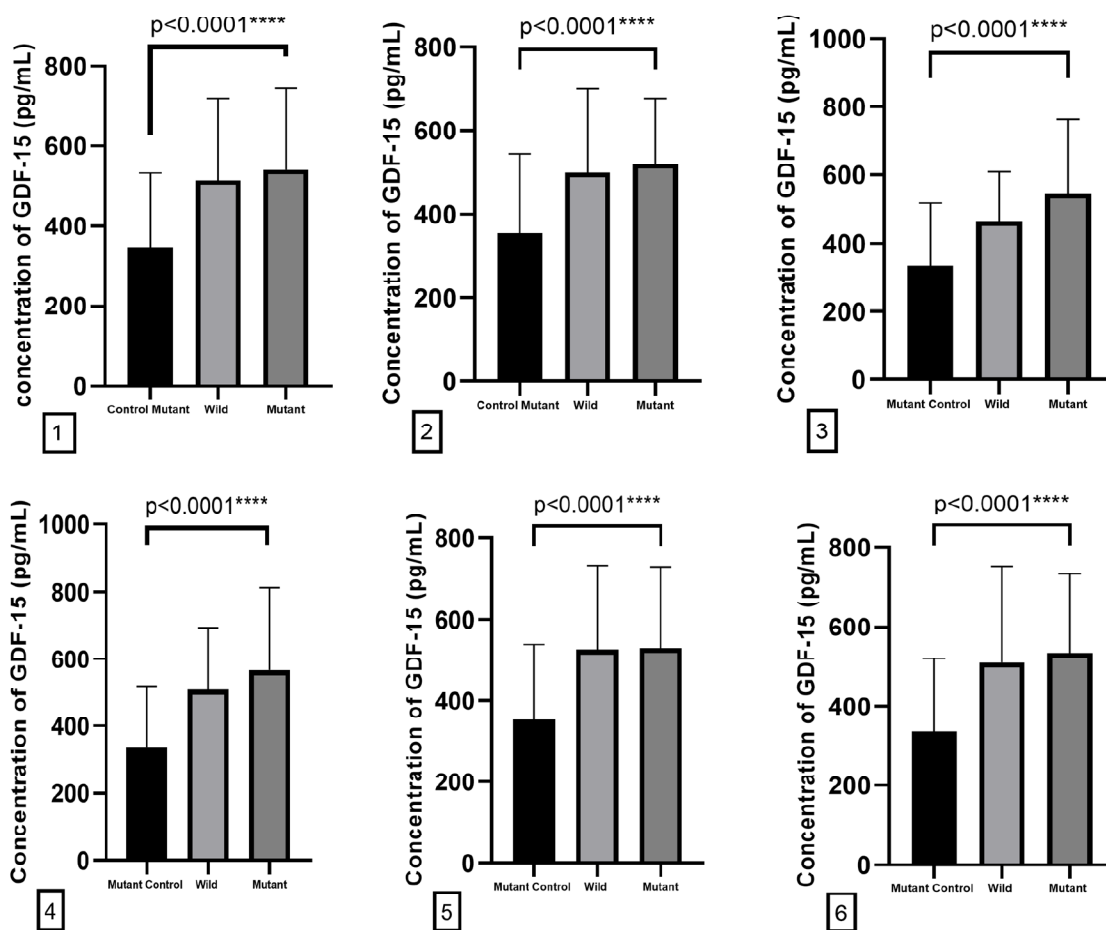


Foram realizadas análises dos níveis de GDF-15 entre os pacientes do grupo 1 e os controles que também possuíam esses alelos. Observou-se que os níveis de GDF-15

foram significativamente mais elevados entre os pacientes com e sem os alelos de risco, demonstrando uma associação com a presença do tumor e não com os SNPs (figura 21).

Contudo, ao compararmos os níveis de GDF-15 entre os pacientes, segmentando-os de acordo com os alelos de risco, não encontramos diferenças estatisticamente significativas. Isso significa que conseguimos demonstrar que os níveis elevados de GDF-15 nesses pacientes não foram correlacionados com os SNPs, mas sim com a perda de peso e a presença do tumor.

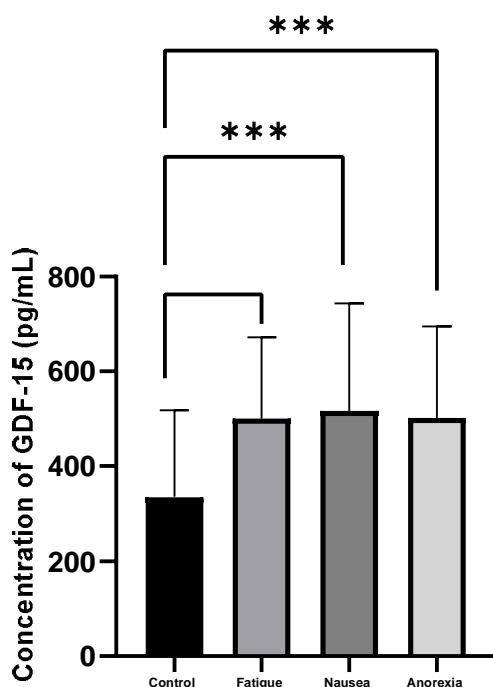
**Figura 21:** Níveis de GDF-15 quantificados de soro de pacientes do grupo 1 (n=83) comparado com o grupo 3 (n=67) subdivididos pela presença do alelo de risco rs4291 (1), rs1799964 (2), rs4946935 (3), rs42451 (4), rs1554973 (5), rs1935949 (6). Os valores são expressos em pg/mL após cálculo da média dos níveis dos pacientes e controle sendo comparados através do teste Kruskal-Wallis onde \*\*\*\* $p < 0.0001$ .



No que se refere aos três sintomas mais frequentemente relatados, fadiga, náusea e anorexia, foi evidenciado que os participantes do grupo 1 (com perda de peso  $\geq 5\%$ )

apresentam níveis consideravelmente elevados de GDF-15 circulante em comparação com os indivíduos do grupo 3 (controle), como ilustrado na figura 22.

**Figura 22:** Níveis de GDF-15 quantificados de soro de pacientes do grupo 1 (n=83) de acordo com sinais e sintomas coletados de acordo com o questionário. Os valores foram expressos em pg/mL após cálculo da média dos níveis dos pacientes e do controle sendo comparados através do teste Kruskal-Wallis onde \*\*\*\*p<0.0001, \*\*\*p<0.001.



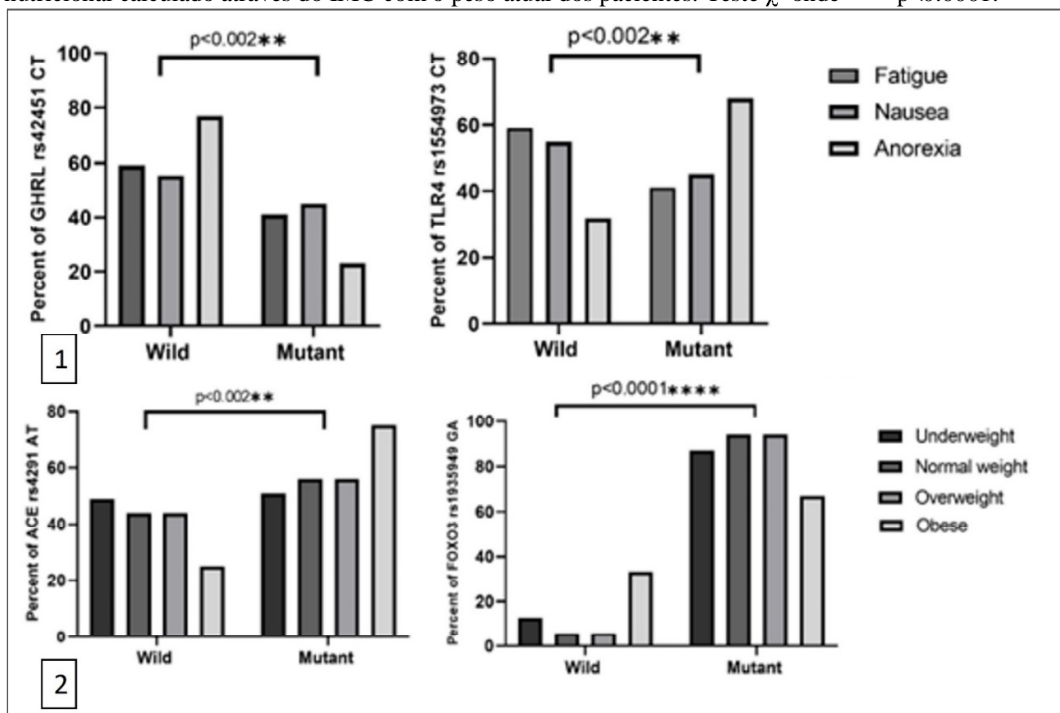
### 5.6.2 SNPs e as possíveis associações com os dados clínicos dos pacientes

Investigou-se o GDF-15 e as possíveis associações, então foi examinado os SNPs em busca de correlações com a presença dos alelos de risco, explorando possíveis associações entre os SNPs e os sinais e sintomas, sexo e o IMC dos pacientes do grupo 1.

No que se refere ao sexo, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os alelos de risco dos seis SNPs analisados (dados não mostrados).

Ao associar os alelos de riscos dos SNPs com os sinais e sintomas foi observado valores estatisticamente significantes em relação a dois SNPs, o rs15554973 (TLR4) e o rs42451 (GHRL), que se mostraram mais frequentes entre os pacientes que relataram os sinais e sintomas de cansaço, náusea e anorexia (figura 23.1). Por outro lado, os SNPs dos genes ECA, FOXO3, TLR4 e TNF- $\alpha$  não demonstraram relação estatisticamente positiva com os sinais e sintomas relatados.

**Figura 23:** (1) Polimorfismos rs15554973 (TLR4) e rs42451 (GHRL) analisados do grupo 1 (n=90) subdivididos pelos sinais e sintomas coletados através dos questionários. Teste  $\chi^2$  onde  $**p<0.002$ . (2) Polimorfismos rs4291 (ECA) e rs193549 (FOXO3) analisados do grupo 1 (n=90) subdivididos pelo estado nutricional calculado através do IMC com o peso atual dos pacientes. Teste  $\chi^2$  onde  $****p<0.0001$ .



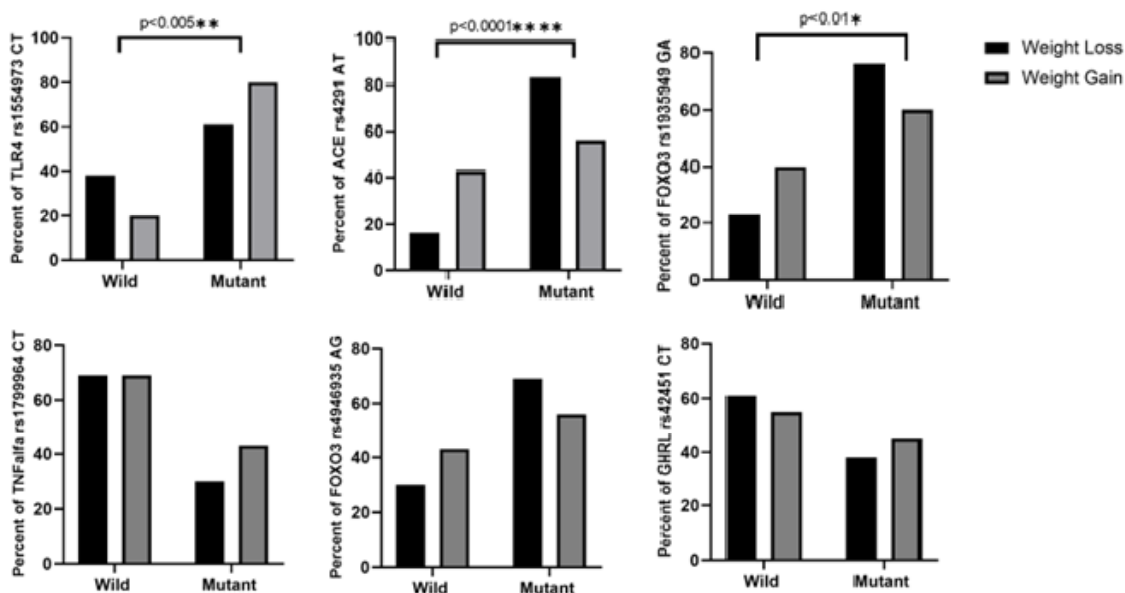
Em relação ao IMC dos indivíduos do grupo 1, observou-se correlação estatisticamente positiva para dois SNPs, sendo o rs4291 (FOXO3) e o rs193549 (FOXO3), como evidenciado na figura 22.2. No entanto, ao realizar as mesmas análises com os SNPs dos genes FOXO3, GHRL, TLR4 e TNF- $\alpha$ , não observamos diferença estatisticamente significativa.

### 5.7 Existe diferença entre os polimorfismos nos pacientes com perda e ganho de peso?

Após verificar que não houve diferença estatística quando comparamos todos os seis SNPs entre o grupo 1 (n=90) e o grupo 3 (n=67) (item 5.5), avaliamos a ocorrência dos alelos nos grupos 1 (n=17) e grupo 2 (n=29), a fim de identificar qual a frequência dos alelos nos pacientes com ganho de peso. Para isso, realizou-se análises das amostras

apenas dos pacientes com perda de peso, portadores de câncer de mama do grupo 1 (n=17) e os pacientes do grupo 2 (n=29) (figura 24).

**Figura 24:** Polimorfismos rs1554973 (TLR4), rs1935949 (FOXO3) e rs4291 (ECA) analisados no grupo 1 com câncer de mama (n=17) x grupo 2 (n=29). Teste Fisher onde \*\*\*\*p<0,0001; \*\*p<0,005; \*p<0,01; \*\*p<0,005. Polimorfismos rs1799964 (TNF- $\alpha$ ), rs42451 (GHRL) e rs4946935 (FOXO3) analisados do grupo 1 (n=17) x grupo 2 (n=29) que não apresentam diferença estatística. Teste Fisher.



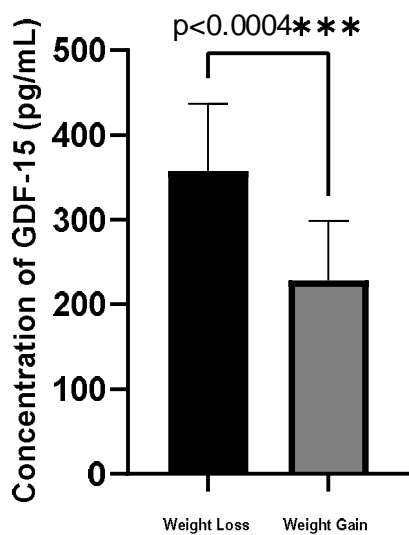
Na tabela 16 e figura 24, observou-se que os SNPs que apresentaram diferença significativa foram os rs1554973 (TLR4), rs1935949 (FOXO3) e rs4291 (ECA), no entanto identificamos que o rs17999647 (TNF- $\alpha$ ), rs42457 (GHRL) e rs4946935 (FOXO3) não apresentaram diferenças quando comparamos o grupo 1 (n=17) e o grupo 2 (n=29).

Ao avaliar a ocorrência dos alelos nas três situações estudadas (grupo 1, grupo 1 x 3, e grupo 1 x 2) identificou-se que o rs1935949 (FOXO3) e rs4291 (ECA) apresentam diferenças estatística em dois casos (dentro do grupo 1 e comparação entre os grupos 1 x 2), evidenciando uma possível relação desses genes no processo de perda ponderal de peso.

Avaliamos também o GDF-15 na mesma situação conforme demonstrado na figura 25. Ficou evidente que os níveis de GDF-15 foram substancialmente superiores nos indivíduos do grupo 1 em comparação ao grupo 2. Esse achado evidencia a presença de níveis elevados de GDF-15 circulante nos pacientes que apresentam perda de peso.

**Tabela 14:** Genes com suas variantes de significância. OR (odds ratio).

Gene	Alelo de risco	OR (95%CI)	Permutated <i>p</i>
TLR4 (rs1554973)	C	0.400 (0.211-0.770)	0.0050
TNF-alfa (rs1799964)	C	0.699 (0.390-1.255)	0.2472
ECA (rs4291)	T	3.982 (2.081-7.485)	<0.0001
FOXO3 (rs4946935)	A	1.760 (1.011-3.200)	0.0768
FOXO3 (rs1935494)	G	2.200 (1.184-4.090)	0.0145
GHRL (rs42451)	T	0.768 (0.445-1.356)	0,3893

**Figura 25:** Níveis de GDF-15 quantificados de soro de pacientes do grupo 1 com câncer de mama (n=17) comparado com os pacientes do grupo 2 (n=29). Os valores foram expressos em pg/mL após cálculo da média dos níveis dos pacientes sendo comparados através do teste Mann Whitney onde \*\*\* $p < 0.004$ .

## 6 DISCUSSÃO

A caquexia associada ao câncer, também chamada de síndrome do desperdício, é uma síndrome multifatorial que se caracteriza por uma perda grave de peso e massa muscular, acompanhada de sintomas como fraqueza e fadiga (EVANS *et al.*, 2008; FEARON *et al.*, 2011).

Essa condição é comum em pacientes com doença maligna avançada e tem impactos severos no estado nutricional, levando à perda de peso corporal, anorexia, astenia e anemia. Nos estágios iniciais, esses sintomas podem variar em intensidade. A caquexia faz com que o corpo utilize outras fontes de energia, como músculos e tecido adiposo, devido à falta de nutrição (ATHEOLOGIDES, 1979).

Essas mudanças metabólicas, induzidas diretamente pelo tumor, comprometem o estado nutricional e afetam a capacidade do paciente de combater infecções e responder ao tratamento por quimioterapia e radioterapia. Em decorrência desses efeitos adversos, ocorre um declínio geral na saúde do paciente (DEWYS, 1986).

Quando associado a quimioterapia, a perda de peso em pacientes pode ser resultado de vários fatores, como a diminuição da ingestão dos alimentos devido a náuseas e vômitos, má absorção dos nutrientes, hipermetabolismo decorrente da doença e o envolvimento de diversas vias moleculares que induzem a anorexia e perda de massa muscular (FEARON, 2008; NI, ZHANG, 2020).

### 6.1 Características dos pacientes oncológicos

Ao analisar as características do grupo 1 (com perda de peso), notamos que 54 (60%) eram do sexo masculino, enquanto 36 (40%) eram do sexo feminino, indicando uma predominância de pacientes do sexo masculino (tabela 5). É relevante observar que a maioria dos estudos sobre caquexia associada ao câncer concentra-se em dados de perda de peso em indivíduos do sexo masculino, com poucas publicações discutindo essa disparidade entre os sexos.

Em alguns estudos, foi observada uma maior depleção muscular em homens com câncer de pulmão e câncer gastrointestinal em comparação com mulheres, como relatado por BARACOS *et al.* (2010) e ANOVEROS-BARREIRAS *et al.* (2019). STEPHENS *et al.* (2012) também destacaram que a depleção muscular tende a ser mais acentuada em homens, acompanhada de uma maior redução na força muscular e qualidade da musculatura quando comparados a mulheres.

Essas diferenças podem ser atribuídas a várias características fisiológicas distintas entre homens e mulheres, incluindo a composição das fibras musculares e a função mitocondrial. Os músculos femininos geralmente demonstram maior resistência à fadiga e melhor qualidade mitocondrial.

Além disso, padrões de expressão gênica muscular também variam, com uma maior prevalência de genes relacionados à função mitocondrial em mulheres e genes relacionados ao catabolismo proteico em homens. Essas diferenças podem contribuir para a maior incidência de caquexia, perda de peso e perda muscular em pacientes do sexo masculino com câncer, levando a piores desfechos em comparação com suas contrapartes do sexo feminino (ZHONG; ZIMMERS, 2020).

Em relação a prevalência dos tipos de tumores dos pacientes, encontrou-se que 52 (57%) apresentaram câncer no sistema gastrointestinal, seguido do câncer de cabeça e pescoço que acometeu cerca de 16 (17,8%) e câncer de mama com 13 (14,4%) (tabela 6).

A literatura científica indicou que os cinco tipos de câncer que podem estar mais associados à perda de peso incluem: câncer colorretal, pancreático, gastroesofágico, ovariano e pulmonar (NICHOLSON *et al.*, 2018). Assim como o câncer de cabeça e pescoço também se apresenta como um dos tipos mais prevalentes nos casos de emagrecimento acentuado (FEARON, 2008). Sendo assim diversos estudos têm procurado medir a frequência da caquexia em pacientes com câncer.

A desnutrição é comum em pacientes com câncer gastrointestinal e de cabeça e pescoço devido à ingestão insuficiente de calorias e nutrientes, principalmente proteínas. Isso é particularmente preocupante, pois ocorre em conjunto com a rápida perda de massa muscular magra, uma característica da caquexia do câncer. Os sintomas como falta de apetite, náuseas, vômitos e distúrbios gastrointestinais devido à quimioterapia aumentam ainda mais o risco de desnutrição na caquexia do câncer (VIGNERON *et al.*, 2022; GRINSTEAD *et al.*, 2022).

A avaliação das necessidades nutricionais é crucial para identificar o risco de desenvolver caquexia em pacientes com câncer gastrointestinal. Além disso, certos grupos, como pacientes com diabetes e obesidade, têm um risco aumentado de desenvolver caquexia relacionada ao câncer devido às suas condições patológicas médicas preexistentes (CHOVSEPIAN *et al.*, 2023).

## **6.2 Peso dos pacientes oncológicos selecionados para o estudo**

Comparou-se o grupo 1, caracterizado pela "perda de peso," com o grupo 2, que apresentou "ganho de peso," visando identificar as diferenças entre eles. O grupo 2 era composto de mulheres com uma média de ganho/manutenção de peso de 2 kg ( $\pm 2,1$ ), e todas apresentaram câncer de mama (tabela 11). Notavelmente, 15 (51,7%) das pacientes do grupo 2 foram classificadas como obesas, 8 (27,6%) como com sobrepeso e 6 (20,6%) com eutrofia (tabela 13).

A relação entre caquexia e pacientes com câncer de mama não tem sido frequentemente descrita. No entanto, a caquexia foi observada em pacientes com câncer de mama e que apresentaram metástases ósseas, fato que pode afetar diretamente a qualidade da massa muscular devido à interação do músculo-esquelético com os ossos, sendo que a redução da massa óssea pode afetar a massa muscular, e o contrário também pode ser considerado (YU *et al.*, 2022; ZHAO *et al.*, 2012; WANING; GUISE, 2015).

Em um estudo de caso, foi verificado que o aumento da carga tumoral no câncer de mama metastático estava fortemente relacionado à perda de massa muscular significativa e à perda excessiva de peso (CONSUL; GUO; ACHARYYA, 2016).

Um estudo publicado por DeWys *et al.* (1980) identificou que apenas 14% dos pacientes com câncer de mama perderam mais de 5% de peso nos últimos 6 meses, enquanto as taxas foram muito mais altas para cânceres de pulmão, pâncreas e gástrico. Além disso, a perda de peso foi identificada como um fator independente associado a uma menor sobrevida.

Uma meta-análise recente revelou que a sarcopenia aumentou substancialmente o risco de mortalidade em diversos tipos e estágios de câncer. Importante notar que o câncer de mama, embora seja o mais prevalente entre as mulheres globalmente, não foi incluído neste estudo (SHACHAR *et al.*, 2016).

Dessa forma, nosso trabalho contribui para identificação da perda de peso significativa nos pacientes do grupo 1 quando comparamos o peso pré (antes do diagnóstico/peso habitual) e após (no dia da coleta) o tratamento quimioterápico (figura 16), evidenciando que a ocorrência da perda de peso foi maior nos pacientes com câncer gastrointestinal e de cabeça e pescoço (tabela 6)

Esses resultados estão alinhados com o estudo conduzido por Martin *et al.* no qual foram observados cerca de 8.160 pacientes com câncer em estágio avançado e/ou metástase, que também apresentaram perda de peso involuntária após início do tratamento oncológico.

No entanto, ao analisarmos o IMC dos pacientes (n=90) constatamos uma prevalência de indivíduos classificados com sobrepeso ou obesidade no início e após o tratamento (tabela 9). Estudos relatam que cerca de 40-60% dos pacientes com câncer (em estágios avançados e/ou com presença de metástase) também foram classificados com sobrepeso e obesidade (MARTIN *et al.*, 2013; GREENLEE *et al.*, 2017; BHUACHALLA *et al.*, 2018).

Dentre os sinais e sintomas mencionados pelo grupo 1 (tabela 10) foi observado que o cansaço, a náusea, a dor e a anorexia foram queixas recorrentes. Esses sintomas podem ser atribuídos à liberação de substâncias liberadas pelo tumor, como citocinas pró-inflamatórias ou lactato, que têm potencial de desencadear essas manifestações clínicas. (BOWER *et al.*, 2013)

Atualmente, temos conhecimento de que a sarcopenia está correlacionada com sintomas como fadiga, anorexia e dor. Esses sintomas podem agravar a toxicidade da quimioterapia e diminuir a qualidade de vida (PRADO *et al.*, 2016). A prevalência da sarcopenia entre os pacientes oncológicos pode variar entre 24-75% de acordo com a localização do tumor (BYE *et al.*, 2017).

A sarcopenia, que envolve perda de massa muscular, é um aspecto importante na síndrome da caquexia, porém sua identificação é desafiadora, uma vez que os pacientes não apresentam características fenotípicas de desnutrição, e muitos são classificados como “saudáveis” de acordo com os padrões internacionais (RYAN *et al.*, 2016; BOZZETTI *et al.*, 2017).

A quimioterapia pode impactar a percepção do paladar, resultando em anorexia, náuseas e vômitos. Esses sintomas podem estar associados a alterações em diversos

neurotransmissores ou neuropeptídeos, incluindo GDF-15, que podem estimular à depressão, dor e diminuição do apetite (EZEIOKE; MORLEY, 2015).

### 6.3 Aspectos genéticos da caquexia

Investigamos seis polimorfismos de nucleotídeo único em cinco genes distintos. Esses genes incluíram ECA (rs4291), FOXO3 (rs4946935 e rs1935949), GHRL (rs42451) e TNF- $\alpha$  (rs1799964). Esses polimorfismos foram selecionados com base em seu potencial de correlação com a caquexia e foram previamente publicados no trabalho de JOHNS *et al.*, (2017).

Os resultados indicaram uma correlação entre o rs4291 do gene ECA e a perda de peso no grupo 1, com uma maior ocorrência do alelo de risco entre esses pacientes (figura 16). Este SNP também mostrou associação com mudanças na classificação nutricional (figura 23.2). Ao comparar o grupo 1 com o grupo 2 (figura 24), também identificamos a presença desse alelo de risco, sugerindo uma possível influência do rs4291 na perda de peso em pacientes com câncer e no desenvolvimento da caquexia.

Durante a progressão da caquexia em animais com melanoma, foi observada a expressão do gene ECA (também conhecida como *ACE1*) nos tecidos musculares. A utilização de um medicamento anti-hipertensivo que inibiu a enzima ECA pode desempenhar um papel na preservação de força muscular. Essa abordagem pode impedir alterações transcricionais induzidas pela caquexia, uma vez que evidências indicam que uma regulação positiva na transcrição desse gene pode contribuir para a perda de massa muscular esquelética (GRAÇA *et al.*, 2023).

Um estudo relatou que a Ang II possui um efeito catabólico direto no músculo esquelético, estimulando a degradação de proteínas em culturas de miotubos, por meio da ativação da via proteolítica ubiquitina-proteassoma. Evidências sugerem que a conversão de Ang II pode contribuir para a perda de tecido corporal em camundongos portadores do tumor MAC16 (*Murine Adenocarcinoma of the Colon 16*) uma vez que o uso do imidapril (inibidor da ECA) atenuou a perda de peso neste modelo animal (SANDERS; RUSSELL; TISDALE, 2005).

A Ang I tem a capacidade de reduzir a atrofia do músculo esquelético induzida pela Ang II, por meio de um mecanismo que envolve a atividade AKT (CISTERNAS *et al.*,

2015). Descobriu-se que a Ang II ativa a ubiquitina ligase, resultando em atrofia muscular, ao gerar estresse oxidativo (ROS) e inibindo a sinalização do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) (YOSHIDA *et al.*, 2013). Sugere-se que a atrofia muscular esteja associada ao comprometimento da via de sinalização do IGF-1 (YANG *et al.*, 2020).

Pesquisas recentes apontam que o gene FOXO3 desempenha um papel fundamental na regulação de diversos processos celulares. Além disso, tem sido objeto de investigação no desenvolvimento e progressão da caquexia. Com base nesse contexto, nosso trabalho investigou dois SNPs do gene de FOXO3 o rs4946935 e o rs1935949.

Foi observado uma associação dos alelos de risco rs4946935 e o rs1935949 do gene de FOXO3 com a perda de peso (figura 19). Além disso, o rs1935949 do gene FOXO3 foi associado à perda de peso nos pacientes com câncer de mama e a sua presença correlacionou-se com a alteração da classificação nutricional (figura 24 e 23.2).

Em um estudo publicado de JOHNS *et al.*, 2016, foi observado que o aumento na expressão do gene FOXO3 no musculo de camundongos caquéticos em comparação aos não caquéticos. Outro estudo realizado por SOLAGNA *et al.*, (2021) demonstrou a indução do gene FOXO3 no tecido muscular de pacientes caquéticos, o qual estava associado a perda de massa muscular e diminuição da função muscular.

Foi observado que a via de sinalização P13K/AKT preveniu a indução das enzimas MAFbx e MuRF1, que são específicas do musculo esquelético, por meio de um mecanismo que envolve a supressão mediada por AKT ativando a via de FOXO (STITT *et al.*, 2004). Outro estudo evidenciou que a perda de sinalização dependente de AKT associada a caquexia no musculo esquelético humano está relacionada a diminuição da atividade dos reguladores da síntese proteica. (SCHMITT *et al.*, 2007).

Quando examinamos o rs42451 do gene da Grelina, nossos dados demonstraram que apesar da diferença significativa entre grupo 1 (figura 19) e os sinais e sintomas (figura 23.1), não foi encontrada presença do alelo de risco nessa população. No entanto, ao compararmos os grupos 1 e 2, não encontramos nenhuma relação estatística com esse SNP.

A grelina é um hormônio produzido principalmente pelo estômago e desempenha um papel na regulação da fome e ingestão de alimentos. Portanto, diversos estudos têm buscado compreender a relação desse hormônio com a caquexia (JONHS *et al.*, 2017; BAESSLER *et al.*, 2007).

Níveis elevados de grelina podem representar um mecanismo compensatório que visa combater a anorexia associada ao crescimento tumoral. Essa resposta endócrina, chamada “resistência à grelina”, tem sido observada em pacientes com câncer. Estudos clínicos com altas doses de grelina têm buscado neutralizar a anorexia em pacientes com câncer, visando um tratamento mais eficaz.

A grelina pode exercer influência direta nas células musculares, bloqueando o aumento da degradação de proteínas induzidas por citocinas catabólicas (CHEUNG *et al.*, 2013). Estudos também indicaram que os níveis de grelina foram 50% mais altos em pacientes com caquexia do câncer, conforme relatado por GARCIA *et al.* (2005). Recentemente, a grelina tem sido alvo em estudos clínicos como uma possível abordagem terapêutica para pacientes com anorexia ou em quimioterapia.

Estudos têm demonstrado que a administração de grelina resultou no aumento da ingestão de alimentos e na melhor apreciação da refeição em pacientes com anorexia oncológica. Os resultados demonstram uma melhora significativa na massa magra, massa corporal total e força em pacientes com câncer. (NEARY *et al.*, 2004; NAGAYA *et al.*, 2006). Esses achados sugerem que a grelina desempenha um papel importante na regulação de massa muscular e pode ser alvo terapêutico na anorexia e perda de peso em pacientes com câncer (HIURA *et al.*, 2012).

Na caquexia, a grelina pode atuar como um mecanismo compensatório para estimular o apetite diante da drástica redução do consumo alimentar e da intensa perda de peso, estabelecendo uma ligação entre o trato gastrointestinal e a perda de músculo esquelético (KHATIB *et al.*, 2018).

Outro gene que desempenha um papel importante na progressão da caquexia é o Toll-like receptor 4 (TLR4), sendo uma proteína do sistema imunológico envolvida com o reconhecimento e resposta a patógenos. Sua expressão ocorre em vários tecidos, incluindo o músculo esquelético (KOPP *et al.*, 2018).

Não identificamos uma correlação entre rs1554973 do TLR4 no grupo 1 (figura 19). No entanto, ao comparar o grupo 1 com o grupo 2, notamos a frequência do rs1554973 (figura 24), evidenciando sua relação com a perda de peso desses pacientes e sua possível associação com os sinais e sintomas relatados pelos pacientes (figura 23.1). Estudos pré-clínicos sugerem que o bloqueio de TLR4 melhora a função e qualidade da massa muscular em animais com caquexia.

Um estudo recente destacou a expressão diferencial de genes TLR em camundongos caquéticos em comparação com controles não caquéticos. Além disso, os resultados desse estudo sugerem que o aumento da expressão de mRNA de TLRs pode ser influenciado por fatores secretados por células tumorais, levando a padrões distintos de expressão de TLR (BOHNERT *et al.*, 2019).

A ativação do receptor de TLR está diretamente associado a atrofia dos miotubos em camundongos, causando caquexia. Neste modelo murino, a ativação de TLR4 foi desencadeada pela captação celular de altos níveis de proteína de choque térmico 70 (Hsp70) e Hsp90, que são secretados por células tumorais por meio de vesículas extracelulares (EVs). Essa ativação do TLR4 correlacionou-se com uma evidente perda de massa muscular e aumento dos níveis circulantes de TNF- $\alpha$  e IL-6 (ZHANG *et al.*, 2017). Pesquisas demonstram que a inibição farmacológica de TLR4 em camundongos caquéticos resultou na supressão da atrofia dos adipócitos e reduziram a infiltração de macrófagos no tecido adiposo (HENRIQUES *et al.*, 2018). Esses achados podem indicar a relevância do TLR4 na patogênese da caquexia e sugerem que a inibição pode ser uma possível abordagem terapêutica.

Os resultados indicam que o rs1799964 (TNF- $\alpha$ ) não possui relação com a perda ponderal de peso entre os pacientes oncológicos, mesmo ao comparar os grupos 1 e 2. As terapias direcionadas ao TNF- $\alpha$  são objeto de controversas, e alguns estudos sugerem que o aumento da produção de fatores pró-caquéticos ou pró-inflamatórios, como TNF- $\alpha$  e IL-1, promovem o catabolismo (MI *et al.*, 2012; MANTOVANI *et al.*, 2010; MANTOVANI *et al.*, 2000).

O fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) apresenta um papel importante na resposta imunológica. A produção exacerbada dessa citocina vem sendo relacionada com o desenvolvimento da caquexia por acreditar-se que o excesso dessa citocina pode desencadear a degradação muscular, inibição da síntese de proteínas e aumento do gasto energético (hipermetabolismo), levando ao consumo de massa muscular e tecido adiposo (PATEL *et al.*, 2017; REID, LI, 2002).

Os resultados do presente estudo indicam que os SNPs nesta população podem estar associados ao ambiente em que os pacientes estão inseridos, mostrando a influência dos alelos de risco dos genes ECA e FOXO3 na perda de peso em pacientes com câncer (figura 19). Também se encontrou correlações entre os genes ECA e FOXO3 (rs1935949) com a classificação nutricional (figura 23.2), bem como entre ECA, FOXO3 (rs1935494),

TLR4 com o emagrecimento, (figura 23.1 e 24) e GHRL e TLR4 com os sinais e sintomas relatados pelo grupo 1 (figura 23.1). Isso ressalta a complexa interação entre genética e ambiente, levando a variações nos sintomas e na manifestação da condição, mesmo em indivíduos com a mesma mutação associada à doença.

#### **6.4 Níveis de GDF-15 estão aumentados nos pacientes oncológicos com perda de peso**

Evidências indicam que a caquexia associada ao câncer está relacionada a complexas alterações neuro-inflamatórias no cérebro. Os tumores resultam em modificações nos neurotransmissores e neuropeptídeos que afetam o hipotálamo, uma região crítica para o desenvolvimento da caquexia por ocasionar a desregulação da ingestão alimentar e o gasto energético corporal (MARTINEZ-SANCHEZ *et al.*, 2014).

Esses achados destacam a importância do sistema nervoso central na fisiopatologia da caquexia. Além das citocinas, como TNF- $\alpha$ , outro fator de grande relevância nessa síndrome é a citocina GDF-15 (AHMED *et al.*, 2021; SURIBEN *et al.*, 2020; SIDDIQUI *et al.*, 2022), que quando elevados estão associados a distúrbios do balanço energético, progressão do câncer, anorexia induzida por quimioterapia e náuseas matinais.

Avaliou-se os níveis de GDF-15 no soro de pacientes do grupo 1 e identificamos resultados promissores. Não houve aumento dos níveis de GDF-15 à medida que a gravidade da perda de peso dos pacientes (figura 17.3), mas quando comparamos os níveis circulantes dessa proteína com o grupo 3, encontramos diferenças significativas (figura 18). Esses achados sugerem que a presença de GDF-15 circulante nos pacientes do grupo 1 pode desempenhar um papel na perda de peso.

Ao comparar o grupo 1 com o grupo 3 e avaliar a relação dos alelos de risco, notamos que os pacientes do grupo 1 que apresentam o alelo de risco têm níveis significativamente mais altos de GDF-15 em comparação com os pacientes do grupo 3 que também possuem o alelo de risco (figura 21). Isso sugere que os níveis de GDF-15 podem estar associados ao tumor e não aos SNPs, sendo importante explorar essa relação em novos estudos.

Curiosamente, ao comparar o grupo 1 com o grupo 2, encontrou-se diferenças positivas, o que indica que esses níveis elevados de GDF-15, além de estarem associados ao tumor, podem estar relacionados ao processo de emagrecimento (figura 23).

Estudos em modelos animais corroboram esses resultados, nos quais camundongos injetados GDF-15 recombinante ou transplantados com tumores superexpressando GDF-

15 apresentaram diminuição da ingestão de alimentos e perda de peso. Por outro lado, o camundongos com caquexia tratados com anticorpo anti-GDF15 apresentaram ganho de peso e recuperação de tecido muscular e adiposo (MAEHG *et al.*, 2022).

Além disso, foi identificada uma correlação entre os níveis circulante de GDF-15 e a caquexia, sendo demonstrado que a perda de peso corporal induzida por GDF-15 é mediada pelo complexo RET/GFRAL em neurônios do tronco cerebral (GAO *et al.*, 2021). Em estudos pré-clínicos, o anticorpo anti-GFRAL 3P10 inibiu a sinalização do RET, impedindo a interação do RET com o GFRAL, resultando em melhor a qualidade de vida e a massa magra (SURIBEN *et al.*, 2020).

Estudos demonstram que a sinalização de GDF-15 está correlacionada com a ocorrência de náusea e anorexia induzida pela quimioterapia, através da ação do nervo vago (AP) e núcleo do trato solitário (NTS), localização central para GFRAL/RET, além de observar o aumento de GDF-15 em camundongas e humanos tratados com cisplatina (HSU *et al.*, 2017). Estudos mostram que GDF-15 desempenha um papel na indução de náusea e mal-estar em camundongos magros ou obesos, além de contribuir para o mal-estar induzido por quimioterapia. Nesse contexto, o GDF-15 pode desencadear a anorexia por meio da indução de náusea e/ou através de respostas neurológicas. Esses dados têm relevância clínica, uma vez que náuseas e anorexia induzidas pela quimioterapia continuam sendo sintomas clínicos significativos, mesmo quando o vomito está controlado (BASCH *et al.*, 2011; COHEN *et al.*, 2007; VAN LAAR *et al.*, 2015).

Estudos conduzidos Tsai et al. (2015) demonstraram que os níveis séricos de GDF-15 exibem variações diurnas, semelhante as da leptina. Eles também observaram alterações sutis nos níveis de GDF-15 após a alimentação e sugerem que essa proteína não possui efeitos na saciedade, mas atua como um regulador da homeostase energética a longo prazo (TSAI *et al.*, 2015). Em resumo, evidências indicam que o GDF15-GFRAL-RET é uma via neuronal central responsável pela regulação da alimentação e dos comportamentos associados, como a aversão alimentar.

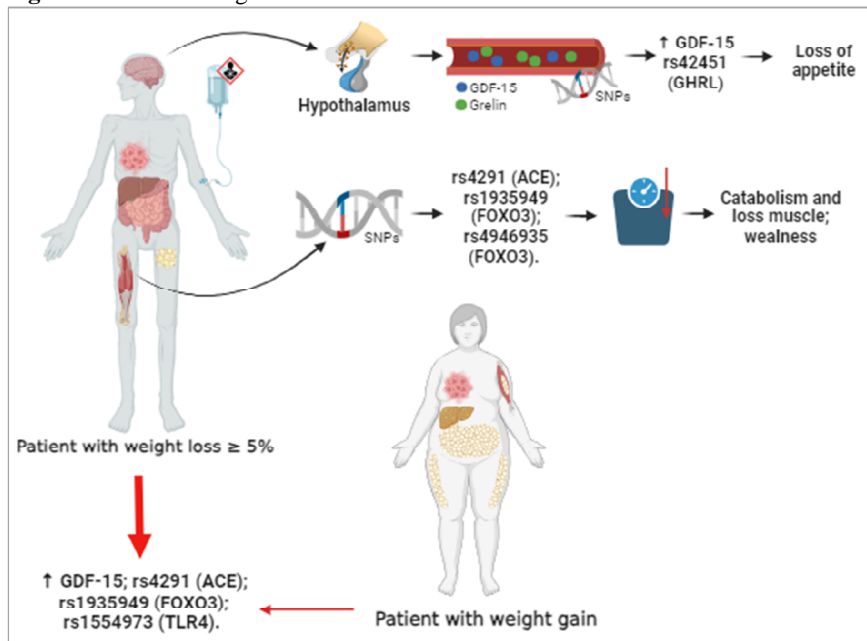
É importante destacar que altos níveis circulantes de GDF-15 podem estar associados à caquexia, resultando na redução da sobrevida do paciente. Portanto, bloquear a produção de GDF-15 pode representar uma estratégia terapêutica promissora. No entanto, essa relação pode ocorrer de forma bidirecional, uma vez que o estresse causado pelo tumor pode levar a aumento nos níveis de GDF-15, e esse aumento, por sua vez,

pode gerar estresse nutricional e aversão à alimentação. (AHMED *et al.*, 2021; ALBURQUERQUE *et al.*, 2022).

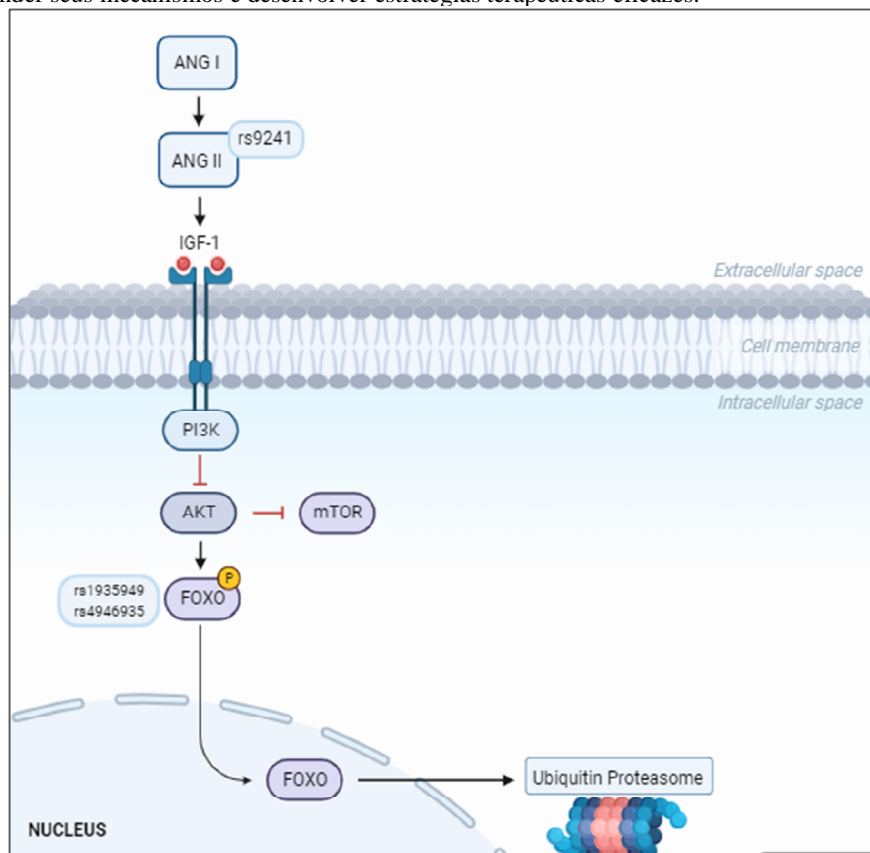
## 7 CONCLUSÃO

O controle da caquexia é uma parte importante do plano de tratamento oncológico, pois os efeitos negativos dessa síndrome estão associados a diminuição da resposta a quimioterapia, efeitos colaterais, redução da qualidade de vida e a sua identificação precoce se faz importante para o paciente e para os serviços médicos. A genotipagem de SNPS biomarcadores e o aumento da liberação da citocina GDF-15 pode ser usada para o diagnóstico precoce da caquexia associada ao câncer.

- Após triagem de aproximadamente 3.800 pacientes, selecionamos 90 participantes com perda de peso e constatamos uma frequência de 2,18% desse sintoma/síndrome entre os pacientes oncológicos do Instituto Ribeirãopretano de Combate ao Câncer;
- Identificamos que os principais sinais e sintomas relatados pelos pacientes foram cansaço, náusea e dor;
- Ao comparar a genotipagem dos pacientes com perda de peso identificamos uma prevalência dos alelos de riscos dos genes ECA (rs4291), FOXO3 (rs1935949 e rs4946935). Apesar da diferença estatística da GHRL (rs42451), não foi encontrado a presença do alelo de risco. No entanto, em nosso estudo, os alelos do TNF- $\alpha$  (rs1799964) e TLR4 (rs1554973) não apresentaram relação com a perda de peso dos pacientes;
- Referente a análise dos pacientes com ganho (n=25) e perda de peso (n=17), identificamos que os rs4291, rs1554973 e rs1935949 foram mais frequentes no grupo de pacientes com perda de peso;
- Os níveis de GDF-15 do soro dos pacientes com perda de peso foram significativamente maiores quando comparados com indivíduos controle (ausência de câncer). Além disso, de acordo com o agravamento da perda de peso o nível dessa proteína aumenta.

**Figura 26:** Conclusão gráfica

**Figura 27:** Uma proposta da atuação dos SNPs na caquexia. O polimorfismo de ECA pode influenciar a AngII, que suprime a via de IGF-1. Isso por sua vez, inibe a via PI3K/AKT, resultando na desativação e deslocamento de FOXO3 que ativa o sistema ubiquitina-proteassoma promovendo a degradação da massa muscular. E a interação complexa entre GDF-15 e a caquexia requer uma investigação mais profunda para compreender seus mecanismos e desenvolver estratégias terapêuticas eficazes.



## REFERÊNCIAS

ADELA, R.; BANERJEE, S. K. GDF-15 as a Target and Biomarker for Diabetes and Cardiovascular Diseases: A Translational Prospective. **Journal of Diabetes Research**, v. 2015, 2015.

ANOVEROS-BARRERA, A. *et al.* Clinical and biological characterization of skeletal muscle tissue biopsies of surgical cancer patients. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 10, n. 6, p. 1356–1377, 1 dez. 2019.

ARNER, P.; LANGIN, D. Lipolysis in lipid turnover, cancer cachexia, and obesity-induced insulin resistance. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 25, n. 5, p. 255–262, 1 maio 2014.

ARTHUR, S. T. *et al.* Cachexia among US cancer patients. **Journal of Medical Economics**, v. 19, n. 9, p. 874–880, 1 set. 2016a.

\_\_\_\_\_. Cachexia among US cancer patients. **Journal of Medical Economics**, v. 19, n. 9, p. 874–880, 1 set. 2016b.

ATLAS, S. **The Renin-Angiotensin Aldosterone System: Pathophysiological Role and Pharmacologic Inhibition**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.amcp.org>.

BAATAR, D.; PATEL, K.; TAUB, D. D. **The effects of ghrelin on inflammation and the immune system** **Molecular and Cellular Endocrinology**, 20 jun. 2011.

BARACOS, V. E. *et al.* Body composition in patients with non-small cell lung cancer: A contemporary view of cancer cachexia with the use of computed tomography image analysis. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 91, n. 4, 1 abr. 2010.

BERARDI, E. *et al.* **A pound of flesh: What cachexia is and what it is not** **Diagnostics** MDPI, , 1 jan. 2021.

BOHNERT, K. R. *et al.* The Toll-Like Receptor/MyD88/XBP1 Signaling Axis Mediates Skeletal Muscle Wasting during Cancer Cachexia. **Molecular and Cellular Biology**, v. 39, n. 15, 1 ago. 2019.

BOWER, J. E.; LAMKIN, D. M. Inflammation and cancer-related fatigue: Mechanisms, contributing factors, and treatment implications. **Brain, behavior, and immunity**, v. 30, n. 0, p. S48, 15 mar. 2013.

BOZZETTI, F. **Forcing the vicious circle: Sarcopenia increases toxicity, decreases response to chemotherapy and worsens with chemotherapy** **Annals of Oncology** Oxford University Press, , 1 set. 2017.

BRICON, T. LE *et al.* Negative impact of cancer chemotherapy on protein metabolism in healthy and tumor-bearing rats. **Metabolism**, v. 44, n. 10, p. 1340–1348, 1 out. 1995.

BYE, A. *et al.* Muscle mass and association to quality of life in non-small cell lung

cancer patients. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 8, n. 5, p. 759–767, 1 out. 2017.

CAMP, K. M.; TRUJILLO, E. Position of the academy of nutrition and dietetics: Nutritional genomics. **Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics**, v. 114, n. 2, p. 299–312, fev. 2014.

CHEUNG, C. K.; CHE, J.; WU, Y. Role of Ghrelin in the Pathophysiology of Gastrointestinal Disease. **REVIEW Gut and Liver**, v. 7, n. 5, p. 505–512, 2013.

CHOI, H. J. *et al.* Chronic Central Administration of Ghrelin Increases Bone Mass through a Mechanism Independent of Appetite Regulation. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, 2 jul. 2013.

CHOVSEPIAN, A. *et al.* Diabetes increases mortality in patients with pancreatic and colorectal cancer by promoting cachexia and its associated inflammatory status. **Molecular Metabolism**, v. 73, 1 jul. 2023.

CISTERNAS, F. *et al.* Angiotensin-(1-7) decreases skeletal muscle atrophy induced by angiotensin II through a Mas receptor-dependent mechanism. **Clinical Science**, v. 128, n. 5, p. 307–319, 2015.

COLE, C. L. *et al.* The Role of Systemic Inflammation in Cancer-Associated Muscle Wasting and Rationale for Exercise as a Therapeutic Intervention. **JCSM clinical reports**, v. 3, n. 2, p. 1–19, jul. 2018.

CONSUL, N. *et al.* Monitoring metastasis and cachexia in a patient with breast cancer: A case study. **Clinical Medicine Insights: Oncology**, v. 10, p. 83–94, 11 set. 2016.

COOPER, D. N. *et al.* An estimate of unique DNA sequence heterozygosity in the human genome **Hum Genet.** [s.l: s.n.].

CUTICCHIA, A. J. *et al.* **Managing all those bytes: The Human Genome Project** **Science**, 1993.

DAY, E. A. *et al.* Metformin-induced increases in GDF15 are important for suppressing appetite and promoting weight loss. **Nature Metabolism** **2019 1:12**, v. 1, n. 12, p. 1202–1208, 9 dez. 2019.

DENG, G. F. *et al.* **The angiotensin II type 1 receptor and receptor-associated proteins** **Cell Research.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.cell-research.com>>.

DEWYS, W. D. *et al.* **Prognostic Effect of Weight Loss Prior to Chemotherapy in Cancer Patients** **The American Journal of Medicine.** [s.l: s.n.].  
**Effect of polymorphism rs1799964 in TNF- $\alpha$  gene on survival in depressive patients with chronic heart failure.** . [s.l: s.n.].

ELING, T. E. *et al.* NSAID activated gene (NAG-1), a modulator of tumorigenesis. **Journal of biochemistry and molecular biology**, v. 39, n. 6, p. 649–655, 2006.

EMMERSON, P. J. *et al.* The metabolic effects of GDF15 are mediated by the orphan receptor GFRAL. **Nature Medicine** 2017 **23:10**, v. 23, n. 10, p. 1215–1219, 28 ago. 2017.

ENGELI, S.; NEGREL, R.; SHARMA, A. M. **Physiology and Pathophysiology of the Adipose Tissue Renin-Angiotensin System Angiotensinogen Expression and Secretion in Adipose Tissue**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://www.hypertensionaha.org>>.

EZEOKE, C. C.; MORLEY, J. E. Pathophysiology of anorexia in the cancer cachexia syndrome. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 6, n. 4, p. 287, 1 dez. 2015.

FALCONER, J. S. *et al.* Cytokines, the acute-phase response, and resting energy expenditure in cachectic patients with pancreatic cancer. **Annals of Surgery**, v. 219, n. 4, p. 325, 1994.

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

GANAL, M. W.; ALTMANN, T.; RÖDER, M. S. SNP identification in crop plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 12, n. 2, p. 211–217, 1 abr. 2009.

GAO, X. *et al.* Extracellular vesicles derived from oesophageal cancer containing P4HB promote muscle wasting via regulating PHGDH/Bcl-2/caspase-3 pathway. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 10, n. 5, 1 mar. 2021.

GARCIA, J. M. *et al.* Active ghrelin levels and active to total ghrelin ratio in cancer-induced cachexia. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 90, n. 5, p. 2920–2926, maio 2005.

GILLIAM, L. A. A.; CLAIR, D. K. ST. Chemotherapy-Induced Weakness and Fatigue in Skeletal Muscle: The Role of Oxidative Stress. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 15, n. 9, p. 2543, 11 nov. 2011.

GOURIN, C. G. *et al.* Effect of Weight Loss on Short-Term Outcomes and Costs of Care After Head and Neck Cancer Surgery. **Rhinology & Laryngology**, v. 123, n. 2, p. 101–110, [s.d.].

GREENLEE, H. *et al.* **Association between body mass index and cancer survival in a pooled analysis of 22 clinical trials** Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention. **Anais...**American Association for Cancer Research Inc., 1 jan. 2017

GRINSTEAD, C. *et al.* Associations of Overall Survival with Geriatric Nutritional Risk Index in Patients with Advanced Pancreatic Cancer. **Nutrients**, v. 14, n. 18, 1 set. 2022.  
HALE, C.; VÉNIANT, M. M. Growth differentiation factor 15 as a potential therapeutic for treating obesity. **Molecular Metabolism**, v. 46, p. 101117, 1 abr. 2021.

HANADA, T. *et al.* Upregulation of ghrelin expression in cachectic nude mice bearing human melanoma cells. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 53, n. 1, p. 84–88, 2004a.

\_\_\_\_. Upregulation of ghrelin expression in cachectic nude mice bearing human melanoma cells. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 53, n. 1, p. 84–88, 2004b.

HIURA, Y. *et al.* Effects of ghrelin administration during chemotherapy with advanced esophageal cancer patients. **Cancer**, v. 118, n. 19, p. 4785–4794, 1 out. 2012.

HORIUCHI, T. *et al.* **Transmembrane TNF- $\alpha$ : Structure, function and interaction with anti-TNF agents***Rheumatology*, 1 mar. 2010.

HSU, J. Y. *et al.* Non-homeostatic body weight regulation through a brainstem-restricted receptor for GDF15. **Nature** **2017 550:7675**, v. 550, n. 7675, p. 255–259, 27 set. 2017.

IDRISS, H. T.; NAISMITH, J. H. TNF $\alpha$  and the TNF receptor superfamily: Structure-function relationship(s). **Microscopy Research and Technique**, v. 50, n. 3, p. 184–195, 1 ago. 2000.

JASCHKE, N. P.; RACHNER, T. D. **Cancer cachexia as a blueprint for treating obesity***Trends in Endocrinology and Metabolism*Elsevier Inc., , 1 jul. 2023.

KIMURA, M. *et al.* Prognostic impact of cancer cachexia in patients with advanced non-small cell lung cancer. **Supportive Care in Cancer**, v. 23, n. 6, p. 1699–1708, 1 jun. 2015.

KWOK, P.-Y.; CHEN, X. **Detection of Single Nucleotide Polymorphisms 43***Detection of Single Nucleotide Polymorphisms*Issues *Mol. Biol.* [s.l: s.n.].

LAGHLAM, D.; JOZWIAK, M.; NGUYEN, L. S. **Renin–angiotensin–aldosterone system and immunomodulation: A state-of-the-art review***Cells*MDPI, , 1 jul. 2021.

LIBERTI, M. V; LOCASALE, J. W. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? HHS Public Access. **Trends Biochem Sci**, v. 41, n. 3, p. 211–218, 2016.

LIBERTI, M. V.; LOCASALE, J. W. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? **Trends in biochemical sciences**, v. 41, n. 3, p. 211, 1 mar. 2016.

LIPPMAN, A. **LED (ASTRAY) BY GENETIC MAPS: THE CARTOGRAPHY OF THE HUMAN GENOME AND HEALTH CARE***Sm. Sci. Med.* [s.l: s.n.].

LU, H. *et al.* **Structure and functions of angiotensinogen***Hypertension Research*Japanese Society of Hypertension, , 1 jul. 2016.

MA, X. *et al.* Ablation of ghrelin receptor in leptin-deficient ob/ob mice has paradoxical effects on glucose homeostasis when compared with ablation of ghrelin in ob/ob mice. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 303, p. 422–431, 2012.

MANTOVANI, G. *et al.* Serum levels of leptin and proinflammatory cytokines in patients with advanced-stage cancer at different sites. **Journal of Molecular Medicine**, v. 78, n. 10, p. 554–561, 18 out. 2000.

\_\_\_\_\_. Randomized Phase III Clinical Trial of Five Different Arms of Treatment in 332 Patients with Cancer Cachexia. **The Oncologist**, v. 15, n. 2, p. 200–211, 1 fev. 2010.

MARTIN, L. *et al.* Diagnostic criteria for the classification of cancer-associated weight loss. **Journal of Clinical Oncology**, v. 33, n. 1, p. 90–99, 1 jan. 2015.

MEDZHITOV, R.; PRESTON-HURLBURT, P.; JANEWAY, C. A. **A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity**. [s.l: s.n.].

MIOT, H. A. **Avaliação da normalidade dos dados em estudos clínicos e experimentais** **Jornal Vascular Brasileiro** Sociedade Brasileira de Angiologia e Cirurgia Vascular, , 2017.

MORRIS, B. J. **Seven sirtuins for seven deadly diseases of aging** **Free Radical Biology and Medicine**, mar. 2013.

\_\_\_\_\_. **FOXO3: A Major Gene for Human Longevity - A Mini-Review** **Gerontology** S. Karger AG, , 16 out. 2015.

MULLICAN, S. E.; RANGWALA, S. M. Uniting GDF15 and GFRAL: Therapeutic Opportunities in Obesity and Beyond. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 29, n. 8, p. 560–570, 1 ago. 2018.

MURPHY, K. T. *et al.* Mechanisms of chemotherapy-induced muscle wasting in mice with cancer cachexia. **JCSM Rapid Communications**, v. 5, n. 1, p. 102–116, 1 jan. 2022.

NAGAYA, N.; KOJIMA, M.; KANGAWA, K. Ghrelin, a Novel Growth Hormone-releasing Peptide, in the Treatment of Cardiopulmonary-associated Cachexia. **Internal Medicine**, v. 45, n. 3, p. 127–134, 1 mar. 2006.

NEARY, N. M. *et al.* Ghrelin Increases Energy Intake in Cancer Patients with Impaired Appetite: Acute, Randomized, Placebo-Controlled Trial. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 89, n. 6, p. 2832–2836, 1 jun. 2004.

NICHOLSON, B. D. *et al.* **Weight loss as a predictor of cancer in primary care: A systematic review and meta-analysis** **British Journal of General Practice** Royal College of General Practitioners, , 1 maio 2018.

OLSON, B. *et al.* Neural Mechanisms of Cancer Cachexia. **Cancers** 2021, Vol. 13, Page 3990, v. 13, n. 16, p. 3990, 7 ago. 2021.

PATEL, H. J.; PATEL, B. M. **TNF- $\alpha$  and cancer cachexia: Molecular insights and clinical implications** **Life Sciences** Elsevier Inc., , 1 fev. 2017.

PEREZ-TILVE, D. *et al.* Ghrelin-induced adiposity is independent of orexigenic effects. **The FASEB Journal**, v. 25, n. 8, p. 2814–2822, ago. 2011.

PETRUZZELLI, M. *et al.* A Switch from White to Brown Fat Increases Energy Expenditure in Cancer-Associated Cachexia. **Cell Metabolism**, v. 20, n. 3, p. 433–447, 2 set. 2014.

PIN, F. *et al.* Cachexia induced by cancer and chemotherapy yield distinct perturbations to energy metabolism. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 10, n. 1, p. 140, 1 fev. 2019.

PORPORATO, P. E. **Understanding cachexia as a cancer metabolism syndrome** *Oncogenesis* Nature Publishing Group, , 22 fev. 2016.

POWRÓZEK, T. *et al.* Relationship between TNF- $\alpha$  –1031T/C gene polymorphism, plasma level of TNF- $\alpha$ , and risk of cachexia in head and neck cancer patients. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 144, n. 8, p. 1423–1434, 1 ago. 2018.

PRADO, C. M. *et al.* Sarcopenia and cachexia in the era of obesity: clinical and nutritional impact. 2016.

ROCHETTE, L. *et al.* Functional roles of GDF15 in modulating microenvironment to promote carcinogenesis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1866, n. 8, p. 165798, 1 ago. 2020.

RYAN, A. M. *et al.* Effects of weight loss and sarcopenia on response to chemotherapy, quality of life, and survival. **Nutrition**, v. 67–68, p. 110539, 1 nov. 2019.

SATO, T. *et al.* **Structure, regulation and function of ghrelin** *Journal of Biochemistry*, fev. 2012.

SCHLEINITZ, D.; DISTEFANO, J. K.; KOVACS, P. Targeted SNP genotyping using the taqman® assay. **Methods in Molecular Biology**, v. 700, p. 77–87, 2011.

SEN, C. K. *et al.* **Glutathione Regulation of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ -Induced NF- $\kappa$ B Activation in Skeletal Muscle-Derived L6 Cells** *BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS*. [s.l: s.n.].

SHELLOCK, F. G.; RIEDINGER, M. S.; FISHBEIN, M. C. Short Communication Brown Adipose Tissue in Cancer Patients: Possible Cause of Cancer-Induced Cachexia. **J Cancer Res Clin Oncol**, p. 11–82, 1986.

SOLAGNA, F. *et al.* Pro-cachectic factors link experimental and human chronic kidney disease to skeletal muscle wasting programs. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 131, n. 11, 1 jun. 2021.

STEPHENS, N. A. *et al.* Sexual dimorphism modulates the impact of cancer cachexia

on lower limb muscle mass and function. **Clinical Nutrition**, v. 31, n. 4, p. 499–505, ago. 2012.

STITT, T. N. *et al.* The IGF-1/PI3K/Akt Pathway Prevents Expression of Muscle Atrophy-Induced Ubiquitin Ligases by Inhibiting FOXO Transcription Factors. **Molecular Cell**, v. 14, n. 3, p. 395–403, 7 maio 2004.

SUMUKADAS, D. *et al.* Effect of perindopril on physical function in elderly people with functional impairment: A randomized controlled trial. **CMAJ. Canadian Medical Association Journal**, v. 177, n. 8, p. 867–874, 9 out. 2007.

TAN, B. H. L. *et al.* Biomarkers for cancer cachexia: Is there also a genetic component to cachexia? **Supportive Care in Cancer**, v. 16, n. 3, p. 229–234, 11 dez. 2008.

TSAI, V. W. W. *et al.* The anorectic actions of the TGF $\beta$  cytokine MIC-1/GDF15 require an intact brainstem area postrema and nucleus of the solitary tract. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, 27 jun. 2014.

TSAI, V. W. W. *et al.* The MIC-1/GDF15-GFRAL Pathway in Energy Homeostasis: Implications for Obesity, Cachexia, and Other Associated Diseases. **Cell Metabolism**, v. 28, n. 3, p. 353–368, 4 set. 2018.

UNSICKER, K.; SPITTAU, B.; KRIEGLSTEIN, K. The multiple facets of the TGF- $\beta$  family cytokine growth/differentiation factor-15/macrophage inhibitory cytokine-1. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 24, n. 4, p. 373–384, 1 ago. 2013.

VIGNAL, A. *et al.* **A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics** *Genetics Selection Evolution* EDP Sciences, , 2002a.  
 \_\_\_\_\_. **A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics** *Genetics Selection Evolution* EDP Sciences, , 2002b.

VIGNERON, C. *et al.* Assessment of Functional and Nutritional Status and Skeletal Muscle Mass for the Prognosis of Critically Ill Solid Cancer Patients. **Cancers**, v. 14, n. 23, 1 dez. 2022.

WANG, Y. F. *et al.* Targeting cancer cachexia: Molecular mechanisms and clinical study. **MedComm**, v. 3, n. 4, p. e164, 1 dez. 2022.

WANING, D. L.; GUISE, T. A. Cancer-associated muscle weakness: What's bone got to do with it? **BoneKey Reports**, v. 4, 20 maio 2015.

WEBSTER, J. M. *et al.* Inflammation and Skeletal Muscle Wasting During Cachexia. **Frontiers in Physiology**, v. 11, 19 nov. 2020.

WISCHHUSEN, J.; MELERO, I.; FRIDMAN, W. H. **Growth/Differentiation Factor-15 (GDF-15): From Biomarker to Novel Targetable Immune Checkpoint** *Frontiers in Immunology* Frontiers Media S.A., , 19 maio 2020.

- YANG, W. *et al.* Molecular mechanisms of cancer cachexia-induced muscle atrophy (Review). **Molecular Medicine Reports**, v. 22, n. 6, p. 4967–4980, 1 dez. 2020.
- YEOM, E.; YU, K. Understanding the molecular basis of anorexia and tissue wasting in cancer cachexia. **Experimental & Molecular Medicine** 2022 **54:4**, v. 54, n. 4, p. 426–432, 6 abr. 2022.
- YI-PING, L. I. *et al.* Mitochondria Mediate Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B Signaling in Skeletal Muscle Myotubes. <https://home.liebertpub.com/ars>, v. 1, n. 1, p. 97–104, 19 mar. 2008.
- YOSHIDA, T. *et al.* **Molecular mechanisms and signaling pathways of angiotensin II-induced muscle wasting: Potential therapeutic targets for cardiac cachexia** *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* Elsevier Ltd, , 2013.
- ZHANG, G. *et al.* Tumor induces muscle wasting in mice through releasing extracellular Hsp70 and Hsp90. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, 1 dez. 2017.
- ZHANG, H. *et al.* Activation of TLR4 induces inflammatory muscle injury via mTOR and NF- $\kappa$ B pathways in experimental autoimmune myositis mice. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 603, p. 29–34, 7 maio 2022a.
- \_\_\_\_\_. Activation of TLR4 induces inflammatory muscle injury via mTOR and NF- $\kappa$ B pathways in experimental autoimmune myositis mice. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 603, p. 29–34, 7 maio 2022b.
- ZHAO, B. *et al.* **Automated Quantification of Body Fat Distribution on Volumetric Computed Tomography**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://journals.lww.com/jcat>>.
- ZHONG, X.; ZIMMERS, T. A. **Sex Differences in Cancer Cachexia** *Current Osteoporosis Reports* Springer, , 1 dez. 2020.

**ANEXO 1**

biiaromano@gmail.com

Ribeirão Preto, 11 de março de 2020

**AUTORIZAÇÃO**

Venho por meio de esta autorizar o uso do Instituto Ribeirãopretano de Combate ao Câncer, localizado no Hospital Beneficência Portuguesa de Ribeirão Preto/SP para aplicação de questionários, análise de dados de exames e coleta de amostras de sangue de pacientes com cancer que apresentam caquexia, do projeto intitulado: "Aspectos celulares, moleculares, nutricionais e epidemiológicos da caquexia associada ao câncer" sob-responsabilidade da Profª Drª Ana Lúcia Fachin Saltoratto.



Prof. Dr. Adilson Aparecido Faccio

Diretor do Instituto Ribeirãopretano de Combate ao Câncer, localizado no Hospital  
Beneficência Portuguesa de Ribeirão Preto/SP

**ANEXO 2**

**Ribeirão Preto SP**  
Av. Costáble Romano, 2201  
(16) 3803-7000  
CEP 14096-900

**Guarujá SP**  
Av. D. Pedro I, 3300  
(13) 3398-1000  
CEP 11440-003

**www.unaerp.br**

Ribeirão Preto, 11 de março de 2020

**AUTORIZACAO**

Venho por meio desta, autorizar a coletar de 5 ML de sangue de 100 indivíduos saudáveis atendidos no LAC durante o prazo de um ano. O sangue coletado será utilizado no projeto intitulado: "Aspectos celulares, moleculares, nutricionais e epidemiológicos da caquexia associada ao câncer" sob responsabilidade da Profª Drª Ana Lúcia Fachin Saltoratto que esta sendo realizado na Unidade de Biotecnologia Unaerp, sendo que todo material para a coleta será fornecido pelo pesquisador.

**Carla Denipotte Gallon Pitta**

Responsavel pelo Laboratório de Análises Clínicas (LAC) do Curso de Ciências Farmacêuticas da Universidade de Ribeirão Preto

## ANEXO 3



Ribeirão Preto SP  
Av. Costáble Romano, 2201  
(16) 3603-7000  
CEP 14096-900

Guarujá SP  
Av. D. Pedro I, 3300  
(13) 3398-1000  
CEP 11440-003

[www.unaerp.br](http://www.unaerp.br)

Ribeirão Preto, 11 de março de 2020

## AUTORIZAÇÃO

Venho por meio de esta autorizar o uso do laboratório de Biociências da Unidade de Biotecnologia para processamento das amostras de sangue de pacientes com caquexia e amostras controle do projeto intitulado: "Aspectos celulares, moleculares, nutricionais e epidemiológicos da caquexia associada ao câncer" sob-responsabilidade da Profª Drª Ana Lúcia Fachin Saltoratto.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Suzelei de Castro Franca', is written over a horizontal line.

Profa Dra Suzelei de Castro Franca

Coordenadora da Unidade de Biotecnologia da Universidade de Ribeirão Preto

**APÊNDICE 1**  
**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (controle-LAC)**

1. NOME DA PESQUISA:  
**“Aspectos celulares, moleculares, nutricionais e epidemiológicos da caquexia associada ao câncer”**
2. PESQUISADOR RESPONSÁVEL:  
Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Ana Lúcia Fachin
2. 1 MÉDICO RESPONSÁVEL:  
Prof. Dr. Adilson Aparecido Faccio
2. 2 DOUTORANDA:  
Me. Gabriela Gonzalez Segura
3. PATROCINADOR QUE APÓIA FINANCEIRAMENTE A PESQUISA:  
Unidade de Biotecnologia (UNAERP)
4. DESCRIÇÃO DAS INFORMAÇÕES QUE DEVERÃO SER, OBRIGATORIAMENTE, PRESTADAS AOS PACIENTES (SUJEITOS DA PESQUISA)
  1. A justificativa e o objetivo da pesquisa.
  2. Os procedimentos que serão utilizados e o seu propósito, bem como a identificação dos procedimentos que são experimentais.
  3. Os desconfortos e riscos existentes para o paciente (sujeito da pesquisa).
  4. Os benefícios esperados da pesquisa.
  5. Em havendo despesas para o paciente, decorrente de sua participação na pesquisa, informar a ele a forma de como se dará a cobertura dessa despesa, bem como O NOME DA EMPRESA QUE SE RESPONSABILIZOU PELO RESSARCIMENTO.(Unaerp)
  6. A forma de acompanhamento e da assistência que será dada ao paciente, bem como aos seus responsáveis, se necessário, no caso de menores ou incapazes.
  7. A forma de indenização ao paciente, diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa, BEM COMO O NOME DA EMPRESA QUE SE RESPONSABILIZOU POR ESSA INDENIZAÇÃO. (Unaerp)
- 5. AS INFORMAÇÕES PERTINENTES ÀS QUESTÕES ANTERIORMENTE RELACIONADAS, DEVERÃO SER REDIGIDAS, NO CAMPO ABAIXO, RESERVADO PARA ESTE FIM, EM TERMOS SIMPLES E CONHECIDOS PELOS SUJEITOS DA PESQUISA, DE FORMA A LHE PERMITIR ENTENDER, COM CLAREZA E EXATIDÃO, AS RAZOES DA PESQUISA, SEUS RISCOS E BENEFÍCIOS, E DECIDIR, LIVREMENTE, QUANTO A SUA ANUÊNCIA OU NÃO EM PARTICIPAR DO PROJETO.**

Prezado Doador,

Meu nome é Gabriela Gonzalez Segura, sou aluna de Doutorado em Biotecnologia Aplicada á saúde da Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP), orientada pela Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Ana Lúcia Fachin responsável pela pesquisa.

Estou convidando-o para participar do projeto de pesquisa que estou desenvolvendo na Unidade de Biotecnologia da UNAERP.

Este trabalho de pesquisa tem a finalidade de estudar o sangue colhido de pessoas saudáveis doadoras de sangue do **Laboratório de Análises Clínicas (LAC)** da UNAERP, no intuito de utilizar este sangue como controle no nosso projeto que estuda polimorfismos ligados a caquexia induzida por agentes quimioterápicos.

Para participar desta pesquisa precisarei do seu consentimento para a doação de 5 ml de sangue a mais, no momento da coleta de sangue para seu exame usual que será coletado pelos funcionários do LAC. A coleta de sangue não causará risco a sua saúde, sendo que os participantes podem, eventualmente, sentir um desconforto físico (possivelmente o aparecimento de uma mancha roxa no local da picada) ou algum desconforto psicológico devido a “picada”, de modo que, nesse caso, deverão receber assistência conforme as instruções da resolução No 466/2012.

O participante da pesquisa tem a liberdade de retirar o seu consentimento e o material genético e deixar de participar do estudo, a qualquer momento, sem que isso traga prejuízo à continuidade do seu tratamento

Deste modo pretende-se neste trabalho, coletar o sangue de indivíduos saudáveis e aplicar métodos e aparelhos modernos com o objetivo de comparar esta amostra de sangue com os de pacientes oncológicos para analisar os variantes biológicos que podem estar associados com a doença e ao tratamento.

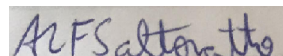
Eu \_\_\_\_\_, abaixo assinado, tendo sido devidamente esclarecido sobre todas as condições que constam do documento “ESCLARECIMENTOS AO SUJEITO DA PESQUISA”, de que trata o Projeto de Pesquisa intitulado “**ASPECTOS CELULARES, MOLECULARES, NUTRICIONAIS E EPIDEMIOLÓGICOS DA CAQUEXIA ASSOCIADA AO CÂNCER**” a ser realizado na Universidade de Ribeirão Preto, que tem como pesquisador responsável o (a) Profa. Dra. Ana Lúcia Fachin Saltoratto, portador do RG: 22236849-4, residente Av Costabile Romano, 280 apto 801, Tel (16) 982381510, especialmente no que diz respeito ao objetivo de pesquisa aos procedimentos que serei submetido, aos riscos e aos benefícios, a forma de ressarcimento no caso de eventuais despesas, bem como a forma de indenização por danos decorrentes da pesquisa, declaro que tenho pleno conhecimento dos direitos e das condições que me foram assegurados, a seguir relacionados:

- 1) A garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento de qualquer dúvida a respeito dos procedimentos, riscos, benefícios e de outras situações relacionadas com a pesquisa e o tratamento a que serei submetido;
- 2) A liberdade de retirar o meu consentimento e deixar de participar do estudo, a qualquer momento, sem que isso traga prejuízo à continuidade do meu tratamento;
- 3) A segurança de que não serei identificado e que será mantido o caráter confidencial da informação relacionada a minha privacidade;
- 4) O compromisso de que me será prestada informação atualizada durante o estudo, ainda que possa afetar a minha vontade de continuar nele participando;
- 5) O compromisso de que serei devidamente acompanhado e assistido durante todo o período de minha participação no projeto, bem como de que será garantida a continuidade do meu tratamento, após a conclusão dos trabalhos da pesquisa;
- 6) O ressarcimento de eventuais despesas decorrentes da minha participação no projeto, a ser promovido pela Unaerp;
- 7) Que o ressarcimento de eventuais despesas, bem como indenização, a título de cobertura material, para reparação de danos imediatos ou tardios, decorrentes de minha participação na pesquisa, serão feitos pela Unaerp.

Declaro, ainda, que concordo inteiramente com as condições que me foram apresentadas e que, livremente, manifesto a minha vontade em participar do referido projeto.

Ribeirão Preto, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

Assinatura do Voluntário



PROF. DRA. ANA LUCIA FACHIN SALTORATTO  
 Endereço Av Costabile Romano, 280 apto 801  
 Ribeirão Preto/SP  
 CEP: 14960-030  
 CPF: 17861266800  
 RG: 22236849-4  
 Email: afachin@unaerp.br

---

Assinatura da doutoranda  
Ma. Gabriela Gonzalez Segura  
Av Presidente Kennedy, 293 – Centro – Barrinha/SP  
CEP: 14860-000  
CPF: 442646178-20  
RG: 49850048-2  
Email: gabrielagonzalezsegura@hotmail.com

## APÊNDICE 2

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (pacientes)

- 1) NOME DA PESQUISA: **“Aspectos celulares, moleculares, nutricionais e epidemiológicos da caquexia associada ao câncer”**
  2. PESQUISADOR RESPONSÁVEL:  
Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Ana Lúcia Fachin
  - 3- MÉDICO RESPONSÁVEL:  
Prof. Dr. Adilson Aparecido Faccio
  - 4- DOUTORANDA:  
Me. Gabriela Gonzalez Segura
  5. PATROCINADOR QUE APÓIA FINANCEIRAMENTE A PESQUISA:  
Unidade de Biotecnologia (UNAERP)
  6. DESCRIÇÃO DAS INFORMAÇÕES QUE DEVERÃO SER, OBRIGATORIAMENTE, PRESTADAS AOS PACIENTES (SUJEITOS DA PESQUISA)
  - 7-A justificativa e o objetivo da pesquisa.
  8. Os procedimentos que serão utilizados e o seu propósito, bem como a identificação dos procedimentos que são experimentais.
  9. Os desconfortos e riscos existentes para o paciente (sujeito da pesquisa).
  10. Os benefícios esperados da pesquisa.
  11. Em havendo despesas para o paciente, decorrente de sua participação na pesquisa, informar a ele a forma de como se dará a cobertura dessa despesa, bem como O NOME DA EMPRESA QUE SE RESPONSABILIZOU PELO RESSARCIMENTO (Laboratorio de Biociencias-Unaerp).
  12. A forma de acompanhamento e da assistência que será dada ao paciente, bem como aos seus responsáveis, se necessário, no caso de menores ou incapazes.
  13. A forma de indenização ao paciente, diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa, BEM COMO O NOME DA EMPRESA QUE SE RESPONSABILIZOU POR ESSA INDENIZAÇÃO. (Laboratorio de Biociencias -Unaerp).
- 5. AS INFORMAÇÕES PERTINENTES ÀS QUESTÕES ANTERIORMENTE RELACIONADAS, DEVERÃO SER REDIGIDAS, NO CAMPO ABAIXO, RESERVADO PARA ESTE FIM, EM TERMOS SIMPLES E CONHECIDOS PELOS SUJEITOS DA PESQUISA, DE FORMA A LHE PERMITIR ENTENDER, COM CLAREZA E EXATIDÃO, AS RAZOES DA PESQUISA, SEUS RISCOS E BENEFÍCIOS, E DECIDIR, LIVREMENTE, QUANTO A SUA ANUÊNCIA OU NÃO EM PARTICIPAR DO PROJETO.**

Prezado Doador,

Meu nome é Gabriela Gonzalez Segura, sou aluna de Doutorado em Biotecnologia Aplicada á saúde da Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP), orientada pela Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Ana Lúcia Fachin responsável pela pesquisa.

Estou convidando-o para participar do projeto de pesquisa que estou desenvolvendo na Unidade de Biotecnologia da UNAERP.

Este trabalho de pesquisa tem a finalidade de estudar o sangue colhido de pacientes atendidos no Instituto Ribeirãopretano de Combate ao Câncer, localizado no Hospital Beneficência Portuguesa de Ribeirão Preto/SP, no intuito de utilizar este sangue como para estudar genes e substancias biologicas relacionadas a caquexia induzida por agentes quimioterapicos.

Para participar desta pesquisa precisarei do seu consentimento para avaliar o seu peso, altura e utilizar um aparelho (Biopedancia) para avaliar a composição corporal e aplicação de questionários para avaliar a condição nutricional do paciente. Além disso, precisarei da sua autorização para a doação de 5 ml de sangue venoso que será coletado pelos funcionários do Instituto Ribeiraopretano de Combate ao Câncer. A coleta de sangue não causará risco a sua saúde, sendo que os participantes podem, eventualmente, sentir um desconforto físico (possivelmente o aparecimento de uma mancha roxa no local da picada) ou algum desconforto

psicológico devido a “picada”, de modo que, nesse caso, deverão receber assistência conforme as instruções da resolução No 466/2012.

O participante da pesquisa tem a liberdade de retirar o seu consentimento e o material genético e deixar de participar do estudo, a qualquer momento, sem que isso traga prejuízo à continuidade do seu tratamento.

Deste modo pretende-se neste trabalho, coletar o sangue de pacientes com cancer e aplicar métodos e aparelhos modernos para analisar os variantes biológicos que podem estar associados com a caquexia e ao tratamento.

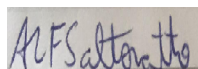
Eu \_\_\_\_\_, abaixo assinado, tendo sido devidamente esclarecido sobre todas as condições que constam do documento “ESCLARECIMENTOS AO SUJEITO DA PESQUISA”, de que trata o Projeto de Pesquisa intitulado “**ASPECTOS CELULARES, MOLECULARES, NUTRICIONAIS E EPIDEMIOLÓGICOS DA CAQUEXIA ASSOCIADA AO CÂNCER**” a ser realizado na Universidade de Ribeirão Preto, que tem como pesquisador responsável o (a) Profa. Dra. Ana Lúcia Fachin Saltoratto, portador do RG: 22236849-4, residente Av Costabile Romano, 280 apto 801, Tel (16) 982381510, especialmente no que diz respeito ao objetivo de pesquisa aos procedimentos que serei submetido, aos riscos e aos benefícios, a forma de ressarcimento no caso de eventuais despesas, bem como a forma de indenização por danos decorrentes da pesquisa, declaro que tenho pleno conhecimento dos direitos e das condições que me foram assegurados, a seguir relacionados:

- 8) A garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento de qualquer dúvida a respeito dos procedimentos, riscos, benefícios e de outras situações relacionadas com a pesquisa e o tratamento a que serei submetido;
- 9) A liberdade de retirar o meu consentimento e deixar de participar do estudo, a qualquer momento, sem que isso traga prejuízo à continuidade do meu tratamento;
- 10) A segurança de que não serei identificado e que será mantido o caráter confidencial da informação relacionada a minha privacidade;
- 11) O compromisso de que me será prestada informação atualizada durante o estudo, ainda que possa afetar a minha vontade de continuar nele participando;
- 12) O compromisso de que serei devidamente acompanhado e assistido durante todo o período de minha participação no projeto, bem como de que será garantida a continuidade do meu tratamento, após a conclusão dos trabalhos da pesquisa;
- 13) O ressarcimento de eventuais despesas decorrentes da minha participação no projeto, a ser promovido pelo Laboratório de Biociências (Unaerp).
- 14) Que o ressarcimento de eventuais despesas, bem como indenização, a título de cobertura material, para reparação de danos imediatos ou tardios, decorrentes de minha participação na pesquisa, serão feitos pelo Laboratório de Biociências (Unaerp).

Declaro, ainda, que concordo inteiramente com as condições que me foram apresentadas e que, livremente, manifesto a minha vontade em participar do referido projeto.

Ribeirão Preto, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Voluntário



Endereço Av Costabile Romano, 280 apto 801  
Ribeirão Preto/SP  
CEP:14960-030

CPF: 17861266800  
RG: 22236849-4  
Email: afachin@unaerp.br

---

Assinatura da doutoranda  
Ma. Gabriela Gonzalez Segura  
Av Presidente Kennedy, 293 – Centro – Barrinha/SP  
CEP: 14860-000  
CPF: 442646178-20  
RG: 49850048-2  
Email: gabrielagonzalezsegura@hotmail.com

### APÊNDICE 3

#### Questionário de avaliação global e alimentar do paciente oncológico e controle.

#### Protocolo de avaliação nutricional do paciente oncológico e controle

Data da avaliação: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Local: \_\_\_\_\_

#### 1 DADOS DE IDENTIFICAÇÃO

Nome completo: \_\_\_\_\_

Nacionalidade: \_\_\_\_\_ Naturalidade: \_\_\_\_\_

Data de nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_ Gênero: ( )F ( )M

Estado civil: \_\_\_\_\_ Raça/cor: ( ) Branca ( ) Preta ( ) Parda ( ) Amarela ( )

Indígena

#### 2 DADOS SOBRE O CÂNCER (CRF)

Data do diagnóstico histológico: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Localização: \_\_\_\_\_

Tipo

histológico \_\_\_\_\_

Estadiamento atual: T \_\_\_\_ N \_\_\_\_ M \_\_\_\_ EC \_\_\_\_

Tratamentos prévios para o câncer:

Cirurgia Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Tipo de cirurgia (ESPECIFIQUE): \_\_\_\_\_

#### Quimioterapias Prévias:

DROGA	DOSE	DATA DE INÍCIO	DATA DO TÉRMINO	Nº DE CICLOS	RESPOSTA

**Radioterapias Prévias:** LOCAL IRRADIADO FINALIDADE DATA DE INÍCIO

DATA DE TÉRMINO TOTAL cGy

LOCAL IRRADIADO	FINALIDADE	DATA DE INÍCIO	DATA DO TÉRMINO	TOTAL cGY

#### TRATAMENTO ATUAL PARA O CANCER (CRF)

QUIMIOTERAPIA ( ) PALIATIVA ( ) ADJUVANTE ( ) CURATIVA

### 3 HISTÓRICO FAMILIAR

Histórico de doenças familiares:

Alguns familiares até o segundo grau possui:

diabetes     hipercolesterolemia     hipertensão     doenças cardiovasculares  
 câncer     anemia falciforme     outras:

História genética materna:

História genética paterna:

### 4 ANTROPOMETRIA

MEDIDAS ANTROPOMÉTRICAS	DATA ____/____/____
PESO (Kg)	
ALTURA (cm)	
IMC	
CIRCUNFERÊNCIA DO BRAÇO (CB)	

### 5 HISTÓRIA (ASG)

#### Alteração no peso

Peso Ideal \_\_\_\_\_ Kg

Peso reportado antes da doença \_\_\_\_\_ Kg

Há um mês eu pesava aproximadamente \_\_\_\_\_ Kg Desconhecido ( )

Há seis meses eu pesava aproximadamente \_\_\_\_\_ Kg Desconhecido ( )

Perda total nos últimos 6 meses \_\_\_\_\_ Kg, %perda \_\_\_\_\_

Durante as 2 últimas semanas meu peso: ( ) diminuiu ( ) ficou igual ( ) aumentou

#### Alteração na ingestão alimentar

( ) sem alteração    ( ) alterada \_\_\_\_\_ duração = \_\_\_\_\_ semanas

( ) dieta normal ( ) dieta normal em pouca quantidade ( ) dieta líquida completa

( ) muito pouco de qualquer comida ( ) apenas suplementos hipocalóricos

( ) apenas alimentos por sonda ou veia

Tipo de sonda de alimentação: ( ) Nasogástrica ( ) Orogástrica ( ) Nosaentérica ( )

Gastrostomia

( ) Jejunostomia ( ) Parenteral

#### Sintomas gastrointestinais (que persistam por > 2 semanas)

( ) nenhum ( ) náusea ( ) vômitos ( ) diarreia ( ) anorexia ( ) constipação ( ) mastite ( ) boca seca

( ) problemas para engolir ( ) cheiros me enjoam ( ) alimentos tem gosto estranho na boca

( ) dor onde: \_\_\_\_\_

( ) outros (depressão, problemas dentários ou financeiros): \_\_\_\_\_

### **Capacidade funcional**

- ( ) sem disfunção (capacidade completa)
- ( ) disfunção \_\_\_\_\_ duração = \_\_\_\_\_ semanas
- ( ) não totalmente normal, mas capaz de manter quase todas as atividades normais
- ( ) não está se sentindo bem para a maioria das coisas, mas ficando na cama ou na cadeira menos da metade do dias.
- ( ) capaz de fazer pouca atividade, passando a maior parte do tempo na cadeira ou cama
- ( ) bastante tempo acamado, raramente fora da cama
- ( ) totalmente acamado.

### **Doença e sua relação com necessidades nutricionais**

Demanda metabólica (stress):

- ( ) sem stress ( ) baixo stress ( ) stress moderado ( ) stress moderado ( ) stress elevado

### **Exame físico (para cada categoria especificar: 0 = normal, 1 = leve, 2 = moderado, 3 grave)**

- \_\_\_\_ perda de gordura subcutânea (tríceps, tórax)
- \_\_\_\_ perda muscular
- \_\_\_\_ edema tornozelo
- \_\_\_\_ edema sacral
- \_\_\_\_ ascite

### **Estado de hidratação**

- ( ) sem déficit ( ) déficit leve ( ) déficit moderado ( ) déficit grave

### **Estado muscular (0 = sem déficit, 1 = déficit leve, 2 = déficit moderado, 3 = déficit grave)**

- ( ) têmporas ( ) musculatura inter-óssea ( ) panturrilha
- ( ) clavículas ( ) escápula
- ( ) ombros ( ) coxa (quadríceps)

### **Avaliação subjetiva global**

- \_\_\_\_ A = Bem nutrido
- \_\_\_\_ B = Moderadamente (ou suspeita de ser) desnutrido
- \_\_\_\_ C = Gravemente desnutrido

### **Classificação da Caquexia (CRF)**

- ( ) Pré Caquexia
- ( ) Caquexia
- ( ) Caquexia Refratária

**Crítérios de Classificação:** **Pré-caquexia:** perda ponderal involuntária inferior a 5% em 6 meses + hiporexia | **Caquexia:** perda ponderal involuntária superior a 5% em 6 meses OU IMC menos que 20 kg/m<sup>2</sup> e perda ponderal involuntária superior a 2%. **Caquexia**

**refratária:** paciente terminal com expectativa de vida de 3 meses, ECOG de 3 ou 4, sem resposta à terapia antineoplásica.

## 6 Histórico alimentar ou dietético

### Questionário de Frequência Alimentar

Alimento	Diariamente ou mais de 3x no dia	1 a 3x na semana	Quinzenalmente	Raramente	Nunca	Quantidade
Leite e derivados						
Frutas						
Verduras						
Legumes						
Tubérculos						
Oleaginosas						
Peixe e frutos do mar						
Carne Bovina						
Carne Suína						
Frango						
Pele do frango						
Arroz branco						
Arroz integral						
Feijão						
Lentilha, grão de bico, etc						
Refrigerante						
Bebida alcoólica						
Produtos integrais						
Pães						
Bolos sem recheio						
Doces						
Salgadinho de pacote						
Produtos embutidos						

Que tipo de leite e seus derivados você habitualmente consome?

Integral

Com baixo teor de gorduras (semi – desnatado, desnatado ou light)

Que tipo de gordura é mais usado na sua casa para cozinhar os alimentos?

- a. ( ) Banha animal ou manteiga
- b. ( ) Óleo vegetal como: soja, girassol, milho, algodão ou canola.
- c. ( ) Margarina ou gordura vegetal

Você costuma colocar mais sal nos alimentos quando já servidos em seu prato?

- a. ( ) Sim
- b. ( ) Não

Pense na sua rotina semanal: quais refeições você costuma fazer habitualmente no dia?

Nto, a pontuação final será a soma deles.

<b>REFEIÇÃO</b>	<b>SIM (0)</b>	<b>NÃO (1)</b>
Café da manhã		
Lanche da manhã		
Almoço		
Lanche da tarde		
Jantar		
Ceia		
Pontuação		

Quantos copos de água você bebe por dia? Inclua em seu cálculo sucos de frutas naturais ou chás (exceto café, chá preto e chá mate)

- a.( ) Menos de 4 copos
- b.( ) 8 copos ou mais
- c.( ) 4 a 5 copos
- d.( ) 6 a 8 copos

Você faz atividade física regularmente, isto é, pelo menos 30 minutos por dia, todos os dias da semana, durante seu tempo livre? Considere aqui as atividades da sua rotina diária como o deslocamento a pé ou de bicicleta para o trabalho, subir escadas, atividades domésticas, atividades de lazer ativo e atividades praticadas em academia e clubes. Os 30 minutos podem ser divididos em 3 etapas de 10 minutos

- a. ( ) Não
- b. ( ) Sim
- c. 2 a 4 vezes por semana

Você costuma ler a informação nutricional que está presente no rótulo de alimentos industrializados antes de comprá-los?

- a. ( ) Nunca
- b. ( ) Quase nunca
- c. ( ) Algumas vezes, para alguns produtos
- d. ( ) Sempre ou quase sempre, para todos os produtos