

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

**ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO ACVR2B E DOS NÍVEIS DE GDF-15 E
ADIPONECTINA COM A PERDA DE PESO EM PACIENTES COM CÂNCER
GASTROINTESTINAL**

LAURA DE MARTIN COLETTI

Orientadora: Profa. Dra. Ana Lucia Fachin Saltoratto

RIBEIRÃO PRETO

2024

LAURA DE MARTIN COLETTI

**ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO ACVR2B E DOS NÍVEIS DE GDF-15 E
ADIPONECTINA COM A PERDA DE PESO EM PACIENTES COM CÂNCER
GASTROINTESTINAL**

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

RIBEIRÃO PRETO

2024

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

- Universidade de Ribeirão Preto -

COLETTI, Laura de Martin, 1998-

C694a Associação do polimorfismo ACVR2B e dos níveis de GDF-15 e adiponectina com a perda de peso em pacientes com câncer gastrointestinal. / Laura de Martin Coletti. - Ribeirão Preto, 2022.
74 f. : il. color.

Orientador: Prof.^a Dr.^a Ana Lucia Fachin Saltoratto.

Dissertacao (Mestrado) - Universidade de Ribeirão Preto, UNAERP, Biotecnologia, 2022.

1. Câncer gastrointestinal. 2. Caquexia. 3. Polimorfismo. 4. Adiponectina. 5. Quimioterapia. II. Título.

CDD 660.6

LAURA DE MARTIN COLETTI

**ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO ACVR2B E DOS NÍVEIS DE GDF-15 E
ADIPONECTINA COM A PERDA DE PESO EM PACIENTES COM CÂNCER
GASTROINTESTINAL**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Ribeirão Preto, para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia Aplicada à Saúde.

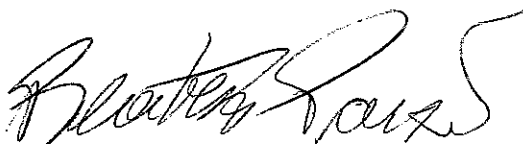
Data da defesa: 30 de agosto de 2024.

Resultado: Aprovada.

BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Ana Lucia Fachin Saltoratto
Presidente/UNAERP



Profa. Dra. Beatriz Maria de Carvalho Paixão
UNAERP



Profa. Dra. Karina Pfrimer
UNAERP

RIBEIRÃO PRETO
2024

Dedico este trabalho a todos que enfrentam ou já enfrentaram o câncer. Em especial, à minha avó Auta (*in memoriam*), que partiu antes de conhecer minha trajetória profissional, mas cujo coração certamente se encheria de orgulho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Dirceu e Dirlei, pelo amor incondicional e pelo constante apoio e confiança em minha jornada acadêmica. Serei eternamente grata e espero um dia poder retribuir tudo o que fizeram e fazem por mim. Agradeço também à minha irmã, Leticia, por me inspirar e torcer pelas minhas conquistas.

À minha orientadora, Ana Lucia Fachin Saltoratto, agradeço pela oportunidade de realizar minha pesquisa em seu laboratório, pelos ensinamentos e pelo aprendizado proporcionado. Ao coordenador da pós-graduação, Prof. Dr. Mozart Marins, pelos ensinamentos e financiamento. À colaboradora Gabriela Gonzalez Segura, agradeço pelos ensinamentos práticos no laboratório.

Aos meus amigos de laboratório do Grupo de Genética Molecular e Bioinformática (GMB), sou grata pela amizade, pelo acolhimento, pelas conversas, ensinamentos e pelos cafés. Sentirei saudades de todos vocês.

Ao meu namorado, Pedro, agradeço por todo o amor, carinho, paciência, companheirismo e pelos ensinamentos.

Agradeço a todos os pacientes e indivíduos que voluntariamente participaram da minha pesquisa, sem eles nada seria possível. Muito obrigada à equipe de enfermagem que realizaram a coleta de sangue dos pacientes oncológicos.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, pelos ensinamentos e pelas conversas compartilhadas.

Por fim, à CAPES e FAPESP pelo apoio financeiro.

RESUMO

COLETTI, L. M. **Associação do polimorfismo ACVR2B e dos níveis de GDF-15 e adiponectina com a perda de peso em pacientes com câncer gastrointestinal.** 74f. 2024. Defesa de dissertação para obtenção do título de Mestra – Programa de pós-graduação em Biotecnologia Aplicada a Saúde, Universidade de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2024.

A perda de peso é comum em pacientes oncológicos, especialmente aqueles com câncer no trato gastrointestinal (CGI), tanto antes do diagnóstico quanto após o início do tratamento quimioterápico. Essa perda de peso resulta em complicações cirúrgicas, taxas de mortalidade mais elevadas, maior risco de toxicidade relacionada aos quimioterápicos e redução na intensidade e na taxa de resposta ao tratamento anticâncer. No entanto, a detecção precoce da perda de peso relacionada ao câncer durante a quimioterapia permanece desafiador. Nesse contexto, pesquisas atuais buscam identificar potenciais biomarcadores para a detecção precoce desta perda de peso. Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) no gene FOXO3, ACVR2B e SELP, além dos níveis circulantes de adiponectina (ApN) e do fator de diferenciação de crescimento 15 (GDF-15) em pacientes brasileiros com CGI, considerando pacientes com perda e sem perda significativa de peso, bem como em indivíduos controles (ausência de câncer). Para isso, foram realizadas coletas de sangue e a aplicação de um questionário para a coleta de dados dos indivíduos selecionados. Posteriormente, a genotipagem foi realizada por meio da técnica de PCR quantitativo para a identificação dos SNPs nos genes FOXO3 (rs1935949), FOXO3 (rs4946935), ACVR2B (rs2268757) e SELP (rs6136). A quantificação e comparação dos níveis plasmáticos de ApN e GDF-15 foram feitas pelo Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA). Os resultados mostram que, entre os genes selecionados, apenas o SNP rs2268757 no gene ACVR2B está associado à perda de peso. Também foi demonstrado que os níveis de ApN e GDF-15 estão elevados em pacientes com CGI e perda de peso, independente do sexo. No entanto, foi encontrada uma correlação fraca entre os níveis plasmáticos de ApN e a porcentagem de perda de peso após o início da quimioterapia. Portanto, é possível concluir que: i) o SNP rs2268757 no gene ACVR2B foi associado à perda de peso em pacientes com CGI; ii) níveis de ApN e GDF-15 estão elevados em indivíduos com CGI e perda de peso.

Palavras-chave: Câncer gastrointestinal, caquexia, polimorfismo, adiponectina e quimioterapia.

ABSTRACT

Weight loss is common in cancer patients, particularly those with gastrointestinal cancer (GI), both before diagnosis and after starting chemotherapy. This weight loss leads to surgical complications, higher mortality rates, increased risk of chemotherapy-related toxicity, and reduced intensity and response rates to anticancer treatment. However, early detection of cancer-related weight loss during chemotherapy remains challenging. Current research aims to identify potential biomarkers for the early detection of this weight loss. Therefore, the objective of this study was to evaluate single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the FOXO3, ACVR2B, and SELP genes, as well as circulating levels of adiponectin (ApN) and growth differentiation factor 15 (GDF-15) in Brazilian patients with GI cancer, considering patients with and without significant weight loss, as well as healthy controls. Blood samples were collected, and a questionnaire was administered to gather data from the selected individuals. Subsequently, genotyping was performed using quantitative PCR to identify SNPs in the FOXO3 (rs1935949), FOXO3 (rs4946935), ACVR2B (rs2268757), and SELP (rs6136) genes. The quantification and comparison of serum levels of ApN and GDF-15 were done using Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). The results show that among the selected genes, only the SNP rs2268757 in the ACVR2B gene is associated with weight loss. It was also demonstrated that ApN and GDF-15 levels are elevated in patients with GI cancer and weight loss, regardless of gender. However, a weak correlation was found between serum ApN levels and the percentage of weight loss after the start of chemotherapy. Therefore, it can be concluded that: i) the SNP rs2268757 in the ACVR2B gene is associated with weight loss in patients with GI cancer; ii) ApN and GDF-15 levels are elevated in individuals with GI cancer and weight loss.

Keywords: Gastrointestinal cancer, cachexia, polymorphism, adiponectin and chemotherapy.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Esquema ilustrativo dos tecidos e órgãos afetados pela caquexia associada ao tumor primário.....14
- Figura 2** – Via de sinalização do gene FOXO3. A diminuição dos níveis de IGF-1 e o aumento de citocina pró-inflamatórias resultam na inibição da via PI3K/AKT e supressão via anabólica mTOR e ativação da via catabólica por defosforilação e translocação do fator de transcrição FOXO3 para o núcleo. No núcleo, FOXO3 ativa a transcrição de MuRF-1 e MAFBX, direcionando proteínas da maquinaria contrátil celular para o SUP.....20
- Figura 3** – **Sinalização intracelular induzida pela ligação da miostatina ou ativina ao seu receptor de ACVR2B.** A ligação da miostatina ou ativina ao receptor ACVR2B promove a fosforilação dos fatores de transcrição SMAD2 e SMAD3, que inibem a via Akt/mTOR e regulam positivamente a expressão de FOXO, resultando na degradação das proteínas musculares via SUP.....21
- Figura 4** – A exposição do endotélio a fatores inflamatórios induz a exocitose dos WPB, resultando na translocação da P-selectina para a membrana plasmática das CEs e plaquetas. A P-selectina liga-se ao PSGL-1, mediando a captura e o rolamento dos leucócitos na corrente sanguínea e promovendo sua migração para os tecidos em processo inflamatório.....22
- Figura 5** – **Sinalização molecular do GDF-15 na caquexia.** Após ser secretado pelo tumor, o GDF-15 irá atuar na AP e no NTS, se ligando ao neuroreceptor GFRAL e formando o complexo GDF15/GFRAL com o correceptor RET. Esse complexo ativa e fosforila as vias de sinalização Erk, Akt e PLC, levando à redução do apetite e da ingestão alimentar.....24
- Figura 6** - **Exemplificação da seleção dos indivíduos da pesquisa.** No Instituto Ribeirão Pretano de Combate ao Câncer foram selecionados os pacientes oncológicos com CGI, sendo aqueles com perda de peso $\geq 5\%$ após o início da quimioterapia agrupados ao Grupo Perda. Os pacientes que não apresentaram perda de peso $\geq 5\%$ ou que ganharam peso após o início do tratamento foram incluídos no Grupo Sem Perda. No Laboratório de Análises Clínicas (LAC)- UNAERP, foram coletados os indivíduos saudáveis (ausência de câncer) e agrupados no Grupo Controle. Todos os indivíduos assinaram o Termo de Livre Consentimento Esclarecido (TCLE), e responderam ao Questionário de Avaliação Global e Alimentar do Paciente Oncológico. Também foram coletadas amostras biológicas para futuras análises.....28
- Figura 7** - Diluição do *Standard* conforme o protocolo do fabricante do kit ELISA Human ADIPOQ / Adiponectin (Sigma Aldrich).....33
- Figura 8** - Diluição do *Standard* conforme o protocolo do fabricante do kit ELISA human GDF-15/MIC-1 (Sigma Aldrich).....34

Figura 9 - Média do peso (kg) e do IMC (kg/m ²) no momento do diagnóstico oncológico (Before) e no momento do recrutamento (After) do Grupo Perda (A e B) (n=49) e do Grupo Sem Perda (C e D) (n=25). Teste <i>Wilcoxon</i>	38
Figura 10 - Níveis plasmáticos de ApN entre o Grupo Controle (n=51) e os pacientes com CGI (n=73). Teste <i>Mann-Whitney</i>	41
Figura 11 - Níveis plasmáticos de ApN entre os Grupo Controle (n=51), Sem Perda (n=24) e Perda (n=49) (A). Níveis plasmáticos de ApN entre os três grupos em comparação com o sexo masculino e feminino (B). Teste <i>Kruskal-Wallis</i> e <i>two-way ANOVA</i>	42
Figura 12 - Correlação entre os níveis plasmáticos de ApN e a porcentagem de perda de peso após o primeiro ciclo do tratamento quimioterápico (n=49). Correlação de <i>Spearman</i>	42
Figura 13 - Níveis plasmáticos de GDF-15 em indivíduos controles (n=51) e pacientes diagnosticados com CGI (n=73). Teste <i>Mann-Whitney</i>	43
Figura 14 - Níveis plasmáticos de GDF-15 entre os Grupos Controle (n=51), Sem Perda (n=25) e Perda (n=48) (A). Níveis plasmáticos de GDF-15 entre os três grupos em comparação com o sexo masculino e feminino (B). Teste <i>Kruskal-Wallis</i> e <i>two-way ANOVA</i>	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação do estado nutricional em adultos e idosos através do Índice de Massa Corporal (IMC).....	30
Tabela 2 - Alelos mutantes e selvagens dos SNPs nos gene FOXO3, ACVR2B e SELP e localização gênica.....	32
Tabela 3 - Concentrações de reagentes para a reação de PCR quantitativa.....	32
Tabela 4 - Parâmetros de ciclagem para a reação.....	33
Tabela 5 - Pacientes incluídos no estudo.....	36
Tabela 6 - Características clínicas dos pacientes do Grupo Perda (n=49) e Grupo Sem Perda (n=25).....	37
Tabela 7 - Classificação do estado nutricional de acordo com o Índice de Massa Corporal (IMC) no momento do diagnóstico (Inicial) e no momento do recrutamento (Final) do Grupo Perda (n=49) e do Grupo Sem Perda (n=25). Teste χ^2	39
Tabela 8 - Sinais e sintomas relatados pelo Grupo Perda (n=49) e Grupo Sem Perda (n=25) após o início do tratamento anticâncer. Teste χ^2 em $*p \leq 0.05$	39
Tabela 9 - Genes com variantes significativamente associadas à perda de peso comparando Grupo Controle e Grupo Câncer. Teste <i>exato de Fisher</i>	40
Tabela 10 - Genes com variantes significativamente associadas à perda de peso comparando Grupo Controle e Grupo Perda. Teste <i>exato de Fisher</i>	40
Tabela 11 - Genes com variantes significativamente associadas à perda de peso comparando Grupo Perda e Grupo Ganho. Teste <i>exato de Fisher</i> em $*p \leq 0.05$	40

LISTA DE ABREVIACÕES

ACVR2B	Receptor de Ativina tipo 2B
ApN	Adiponectina
AP	Área Postrema
CEs	Células Endoteliais
CGI	Câncer Gastrointestinal
Erk	Quinase Regulada por Sinal Extracelular
TGF- β	Fator de Crescimento Transformador Beta
FOXO3	Fator de Transcrição <i>Forkhead Box O3</i>
TGI	Trato Gastrointestinal
GDF-15	Fator de Diferenciação de Crescimento 15
GFRAL	Receptor da Família do Fator Neurotrófico Derivado da Linhagem de Células Gliais Semelhante Alfa
GDNF	Fator neurotrófico derivado da linha celular glial
GLUT-4	Transportador de Glicose Insulina-sensível 4
IGF-1	Fator de Crescimento Semelhante a Insulina 1
IL-6	Interleucina – 6
IL-8	Interleucina – 8
IMC	Índice de Massa Corporal
MIC-1	Citocina 1 Inibitória de Macrófagos
NSCLC	Carcinoma Pulmonar de Células não Pequenas
NTS	Núcleo do Trato Solitário
QT	Tratamento quimioterápico
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PDAC	Adenocarcinoma Ductal Pancreático
PLC	Fosfolipase C-gama
PSGL-1	P-Selectina Glicoproteína Ligante-1
SNP	Polimorfismo de Nucleotídeo Único
SUS	Sistema Único de Saúde
SUP	Sistema Ubiquitina-Proteassoma
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa

WPB Weibel-Palade
 χ^2 qui-quadrado

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	16
1.1.	Câncer Gastrointestinal (CGI)	16
1.2.	A perda de peso em pacientes oncológicos é um processo complexo e multifatorial	17
1.3.	Biomarcadores genéticos na caquexia	19
1.3.1.	Citocinas como biomarcadores na caquexia	22
2.	HIPÓTESE	25
3.	OBJETIVOS	26
3.1.	Objetivo Geral.....	26
3.2.	Objetivos Específicos	26
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1.	Aprovação do Comitê de Ética	27
4.2.	Cálculo amostral da população de estudo	27
4.3.	População de Estudo.....	28
4.3.1.	Pacientes Oncológicos com perda de peso (Grupo Perda)	28
4.3.2.	Pacientes Oncológicos sem perda de peso (Grupo Sem Perda).....	29
4.3.3.	Indivíduos com ausência de câncer (Grupo Controle).....	29
4.4.	Avaliação dos Parâmetros Clínicos e Antropométricos	29
4.5.	Procedimentos	30
4.5.1.	Coleta e Processamento das Amostras	30
4.5.2.	Extração do DNA Genômico	31
4.5.3.	Quantificação do DNA Genômico.....	31
4.5.4.	Genotipagem dos Polimorfismos.....	32
4.5.5.	Quantificação da ApN	33
4.5.6.	Quantificação de GDF-15	34
4.6.	Análises Estatísticas.....	34
5.	RESULTADOS	36
5.1.	Caracterização da população de estudo	36
5.2.	Avaliação da Perda de Peso	37
5.3.	Avaliação dos Sinais e Sintomas	39
5.4.	Polimorfismos de Nucleotídeo Único	40
5.5.	Quantificação da ApN	41

5.6.	Quantificação de GDF-15.....	43
6.	DISCUSSÃO	45
6.1.	Os agentes quimioterápicos na etiologia da perda de peso	45
6.2.	Associação dos Polimorfismos de Nucleotídeos Únicos com a perda de peso	46
6.3.	Níveis elevados de ApN e GDF-15 na perda de peso em pacientes com CGI.....	48
7.	CONCLUSÕES.....	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
	REFERÊNCIAS.....	1
	APÊNDICE 1 - Questionário de avaliação global e alimentar do paciente oncológico.	9
	APÊNDICE 2 - Termo de consentimento livre e esclarecido (TLCE - pacientes oncológicos)	12
	APÊNDICE 3 - Termo de consentimento livre e esclarecido (CONTROLE-LAC).....	15
	ANEXO 1 – Autorização do Prof. Dr. Adilson Aparecido Faccio para coleta de dados e de material biológico dos pacientes no Instituto Ribeirãopretano de Combate ao Câncer..	18
	ANEXO 2 – Autorização da Carla Denipotte Gallon Pitta no laboratório de análises clínicas (LAC) do Curso de Ciências Farmacêuticas da Universidade de Ribeirão Preto.	19
	ANEXO 3 – Autorização do coordenador da Unidade de Biotecnologia Prof. Dr. Mozart Marins.....	20
	ANEXO 4 – Região no genoma humano em que foram identificados a presença dos SNPs nos genes FOXO3 (rs1935949), FOXO3 (rs4946935), ACVRB2V (rs2268757) e SELP (rs6136), respectivamente.	21

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer Gastrointestinal (CGI)

O câncer abrange um conjunto de doenças cujas células sofrem mutações, evoluem e se proliferam anormalmente, podendo invadir e colonizar outros tecidos diferentes daquele no qual o câncer se originou, processo este denominado de metástase (Alberts *et al.* 2017). A incidência de novos casos de câncer no Brasil para cada ano do triênio 2023-2025 será de 704.000 novos casos, sendo que os tumores malignos mais incidentes no país são: o de pele não melanoma, mama feminina, próstata, cólon e reto, pulmão e estômago (INCA, 2022b).

De acordo com a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS, 2020), o câncer é resultado de combinações de fatores genéticos e epigenéticos, como exposição à radiação ultravioleta e ionizante, substâncias químicas cancerígenas, envelhecimento e agentes biológicos cancerígenos. Além disso, o consumo de tabaco, álcool e uma dieta pouco saudável são os principais fatores de risco para o desenvolvimento da doença, juntamente com algumas infecções crônicas, como a infecção pelo *Helicobacter pylori*, o papilomavírus humano (HPV) e os vírus da hepatite B e C (OPAS, 2020). Associados a estes fatores, a obesidade também representa um importante fator de risco para o desenvolvimento dos cânceres associados ao trato gastrointestinal (TGI) (Islami *et al.*, 2018; Morgan *et al.*, 2022).

O câncer gastrointestinal (CGI) abrange tumores do esôfago, estômago, intestino delgado, cólon fígado, pâncreas e reto, sendo no Brasil o câncer de cólon e reto o segundo mais incidente em ambos os sexos (Instituto Nacional do Câncer - INCA, 2022a; Vieira; Fortes, 2015). O INCA em 2018 relatou que o Sistema Único de Saúde (SUS) utilizou aproximadamente R\$ 545 milhões de reais em procedimentos hospitalares e ambulatoriais para atender pacientes com câncer de intestino. Ainda de acordo com o INCA, destes pacientes, cerca de 30% desses casos poderiam ter sido evitados com alimentação saudável, prática de atividade física e redução do consumo de bebidas alcoólicas. Tais medidas profiláticas reduziriam os gastos públicos com o tratamento contra o câncer de intestino em valores que poderiam chegar a R\$ 1 bilhão de reais até 2030. Portanto, o desenvolvimento e a aplicação de estratégias de prevenção e a detecção precoce (rastreamento) destes tumores podem reduzir a incidência e a mortalidade, bem como aumentar a expectativa de vida dos pacientes com câncer. Além disso, do ponto de vista financeiro, a aplicação destas medidas reduziria drasticamente os custos do sistema público de saúde (INCA, 2023).

Pacientes com CGI apresentam maior prevalência de perda de peso quando comparado com os outros tipos de tumores (Caillet *et al.*, 2017). Nos cânceres pancreático e gástrico, os

pacientes apresentam frequência de perda de peso acima de 60 a 80%, enquanto nos cânceres de pulmão, colorretal ou próstata a incidência é superior a 50% (Argilés *et al.*, 2014; Dewys *et al.*, 1980). A perda de peso pode ocorrer antes do início do tratamento devido a obstrução do TGI pela massa tumoral, provocando inflamação sistêmica crônica (Schcolnik-Cabrera *et al.*, 2017). Além de prejudicar a condução do alimento pelo TGI, a presença do tumor também pode afetar a absorção de nutrientes de forma direta ou indireta (Dhanapal, Saraswathi e Govind Rajkumar, 2011; Schcolnik-Cabrera *et al.*, 2017). Por exemplo, pacientes com tumores pancreáticos, apresentam obstrução do ducto pancreático e da segunda porção do duodeno, resultando em sintomas como dor, gastroparesia, estenose duodenal e constipação, que por sua vez podem levar à perda de peso. Tumores no esôfago e estômago frequentemente causam disfagia, restringindo mecanicamente a capacidade de ingestão de alimento (Ockenga e Valentini, 2005; Tan *et al.*, 2014).

1.2. A perda de peso em pacientes oncológicos é um processo complexo e multifatorial

O tecido muscular esquelético é o principal alvo de degradação para a produção de energia em pacientes oncológicos com perda de peso, apresentando ou não lipólise do tecido adiposo, o que pode resultar em desnutrição ou no desenvolvimento da Síndrome Caquexia Associada ao Câncer (Oliveira e Gomes-Marcondes, 2016; Rausch *et al.*, 2021). Em alguns casos, a perda de peso pode ser ocultada pela presença simultânea de obesidade, na qual a diminuição da massa muscular é compensada pelo acúmulo de gordura (Fearon, Glass e Guttridge, 2012a).

A desnutrição está diretamente relacionada ao estado nutricional do indivíduo e pode ser revertida pela ingestão calórica adequada (Meza-Valderrama *et al.*, 2021). Por outro lado, a caquexia está relacionada não apenas à composição corporal, mas também às alterações metabólicas e endócrinas, ativação do sistema imunológico e aos efeitos tóxicos da quimioterapia. Em conjunto, esses fatores contribuem para o desbalanço entre os processos anabólicos e catabólicos, desequilíbrio bioquímico, aumento da lipólise, disfunção mitocondrial, anorexia e alterações no tecido adiposo branco (Oliveira e Gomes-Marcondes, 2016; Rausch *et al.*, 2021). Fearon *et al.* (2011), definiram o diagnóstico de caquexia com base em 3 critérios: (1) perda de peso $\geq 5\%$; ou (2) IMC $< 20 \text{ kg/m}^2$ associado a perda de peso $> 2\%$; ou (3) o diagnóstico de sarcopenia acompanhado de perda de peso $> 2\%$, levando em consideração a redução da ingestão alimentar e a inflamação sistêmica.

O desenvolvimento de caquexia é influenciado pelo tipo de câncer e pelas características individuais do paciente, não estando claro ainda os mecanismos moleculares envolvidos (Figura

1) (Daou, 2019). É agravada pelo catabolismo da massa muscular pré-existente e exacerbada pela terapia contra o câncer, devido a fatores que aumentam a resposta catabólica (Fearon; Arends; Barocos, 2012).

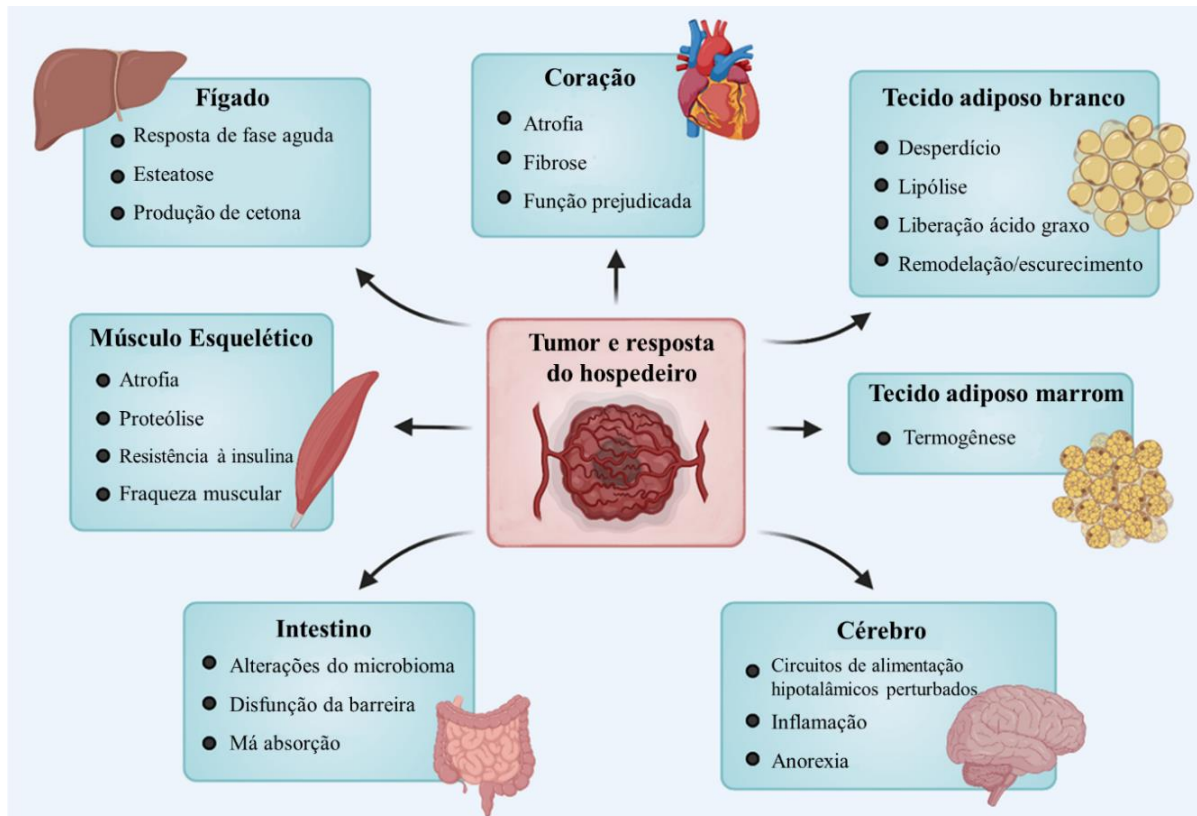


Figura 1 - Esquema ilustrativo dos tecidos e órgãos afetados pela caquexia associada ao tumor primário. Adaptado de Han *et al.*, (2021).

Apesar da importância dos quimioterápicos no tratamento anticâncer, existem cada vez mais evidências que sugerem o envolvimento indireto destes fármacos na perda de peso e no enfraquecimento da musculatura esquelética devido às alterações no paladar e olfato, resultando no comprometimento do apetite e na ingestão alimentar (Caillet *et al.*, 2017; Martin e Freyssenet, 2021; Pin *et al.*, 2019). Além disso, os quimioterápicos podem apresentar efeitos colaterais diretos no TGI como: náuseas, anorexia, constipação, diarreia e vômito (Da Rocha *et al.*, 2019).

À medida que a perda de peso progride, a sensibilidade dos pacientes às intervenções farmacológicas e nutricionais diminui, resultando em complicações cirúrgicas, taxas de mortalidade mais elevadas, maior risco de toxicidade relacionada aos medicamentos quimioterápicos e reduções na intensidade e na taxa de resposta ao tratamento anticâncer (Arends *et al.*, 2021; Wheelwright *et al.*, 2013). Não é possível prever quem desenvolverá ou não perda de peso após o início da quimioterapia, principalmente no contexto da caquexia,

devido a alterações metabólicas e inflamatórias associadas à patologia. Logo, têm se explorado novos potenciais marcadores genéticos com o objetivo de possibilitar a identificação precoce da perda de peso e, assim, permitir a implementação de medidas preventivas (Johns *et al.*, 2017).

1.3. Biomarcadores genéticos na caquexia

O fato de a caquexia afetar múltiplos órgãos torna o seu diagnóstico e manejo desafiador. O principal critério de diagnóstico da síndrome é a perda de peso, no entanto, as diferenças nas definições usadas pelos pesquisadores e profissionais da saúde resultam em menor prevalência da doença, inconsistência entre estudos e populações, e dificuldades na busca por tratamento (Karuppanan, Muthanna e Mohd Fauzi, 2024). Atualmente os biomarcadores para o diagnóstico da caquexia devem ser feitos por meio amostras de plasma/soro e não serem influenciados por fatores como infecções, comorbidades, terapia ou idade (Geppert e Rohm, 2024). Estudos anteriores identificaram potenciais biomarcadores nas citocinas pró-inflamatórias, lipídios, microRNAs e produtos de degradação de proteínas (Argilés, López-Soriano e Busquets, 2019; Cao *et al.*, 2021). No entanto, apesar de promissores, não foram aprovados como testes de diagnóstico clínico.

Nesse sentido, as vias catabólicas e os marcadores inflamatórios têm sido alvo de estudo como biomarcadores, uma vez que o catabolismo da massa muscular esquelética e a inflamação são características-chave da caquexia (Johns *et al.*, 2017). A degradação do músculo esquelético ocorre devido ao desequilíbrio entre as vias de atrofia e hipertrofia, sendo o fator de transcrição *Forkhead Box O3* (FOXO3), além de regular processos de longevidade e autofagia, um indutor da atrofia do músculo esquelético (Fearon, Glass e Guttridge, 2012b; Rausch *et al.*, 2021).

Pacientes oncológicos com perda de peso apresentam níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias e baixos níveis de IGF-1, resultando na redução do anabolismo devido à supressão da via PI3K/AKT (Baracos *et al.*, 2018; Clarke *et al.*, 2007). Essa supressão leva à defosforilação e translocação de FOXO3 para o núcleo, o que induz a transcrição de fatores catabólicos, como MuRF-1 e MAFBX, que por sua vez direcionam proteínas da maquinaria contrátil para a degradação pelo sistema ubiquitina-proteassoma (SUP), resultando na atrofia muscular esquelética (Figura 2) (Baracos *et al.*, 2018; Clarke *et al.*, 2007). Adicionalmente, a presença de Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNPs) no gene FOXO3 em pacientes caquéticos - que consistem em substituições de um único nucleotídeo em locais específicos do genoma - foram associados ao aumento do catabolismo do tecido muscular esquelético e à perda de peso (Johns *et al.*, 2017).

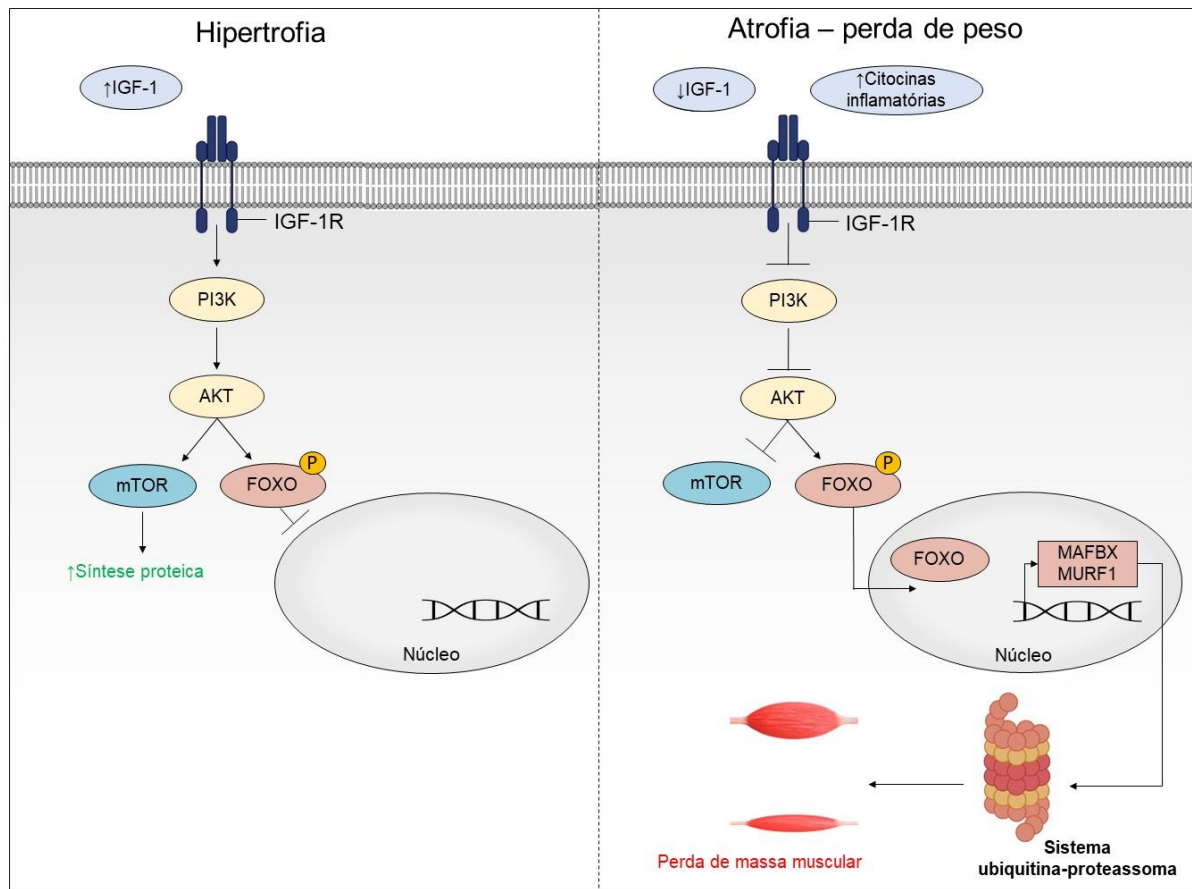


Figura 2 – Via de sinalização do gene FOXO3. A diminuição dos níveis de IGF-1 e o aumento de citocina pró-inflamatórias resultam na inibição da via PI3K/AKT e supressão via anabólica mTOR e ativação da via catabólica por defosforilação e translocação do fator de transcrição FOXO3 para o núcleo. No núcleo, FOXO3 ativa a transcrição de MuRF-1 e MAFBX, direcionando proteínas da maquinaria contrátil celular para o SUP. Adaptado de McKinnell e Rudnicki, (2004)

Além da via de degradação proteica mediada por FOXO3, o receptor de ativina tipo 2B (ACVR2B) é amplamente estudado no contexto da perda de peso por mediar a sinalização das proteínas pertencentes à família do fator de crescimento transformador beta (TGF- β), como a miostatina (GDF8), ativina A, GDF11 e GDF5 (Benny Klimek *et al.*, 2010; Caestecker, de, 2004). Após a ligação dessas proteínas ao receptor ACVR2B, ocorre a fosforilação e ativação dos fatores de transcrição SMAD2 e SMAD3, os quais inibem a via Akt/mTOR e regulam positivamente a expressão de FOXO, resultando em atrofia muscular por meio da transcrição de MuRF-1 e MAFBX (Figura 3) (Setiawan *et al.*, 2023). Uma das estratégias investigadas em estudos com roedores para prevenir e reduzir a perda de massa muscular na caquexia é o bloqueio dos ligantes ao receptor ACVR2B (Nissinen *et al.*, 2016). Semelhante a isso, em camundongos caquéticos, a superexpressão de SMAD7 por meio de vetores virais restringiu a ativação de SMAD2 e SMAD3, resultando em aumentos na massa e na função muscular, que foi associado à redução da expressão de MuRF1 e MAFbx (Winbanks *et al.*, 2016).

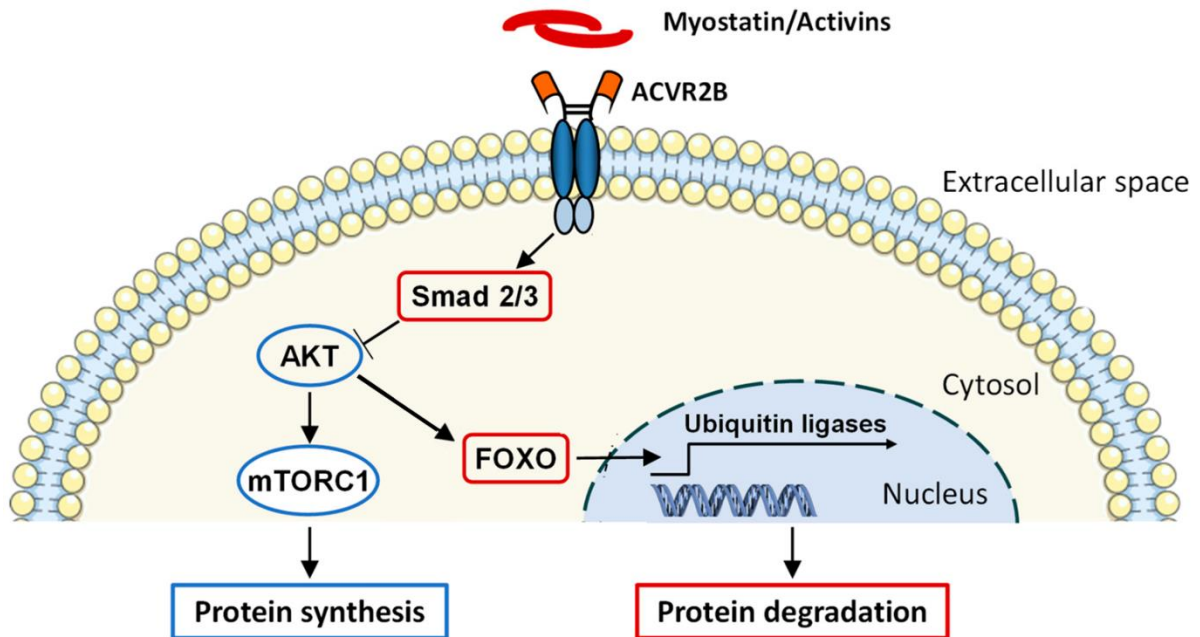


Figura 3 – Sinalização intracelular induzida pela ligação da miostatina ou ativina ao seu receptor de ACVR2B. A ligação da miostatina ou ativina ao receptor ACVR2B promove a fosforilação dos fatores de transcrição SMAD2 e SMAD3, que inibem a via Akt/mTOR e regulam positivamente a expressão de FOXO, resultando na degradação das proteínas musculares via SUP. Adaptada de Hulmi *et al.* (2021).

No contexto da inflamação, a P-selectina, também conhecida como antígeno CD62, é uma glicoproteína transmembrana do tipo 1 pertencente ao grupo de moléculas de adesão celular dependentes de cálcio, expressa em plaquetas e células endoteliais (CEs) (Ley, 2003). Em condições normais, plaquetas e CEs expressam baixos níveis de P-selectina. Entretanto, durante a inflamação induzida pela interação célula-hospedeiro-tumor, há aumentos na liberação da molécula de adesão celular P-selectina, promovendo maior interação entre as plaquetas e CEs com leucócitos (Faraday *et al.*, 2001; Ling *et al.*, 2023). Após a exposição do endotélio a fatores inflamatórios, ocorre a exocitose do corpo de Weibel-Palade (WPB), resultando na translocação de P-selectina para a membrana plasmática das CEs e plaquetas. A P-selectina se liga ao ligante P-selectina glicoproteína ligante-1 (PSGL-1), mediando a captura e o rolamento dos leucócitos nas CEs, o que promove a migração dos leucócitos para o tecido em processo inflamatório (Figura 4) (Hellen *et al.*, 2022; Ley *et al.*, 2007).

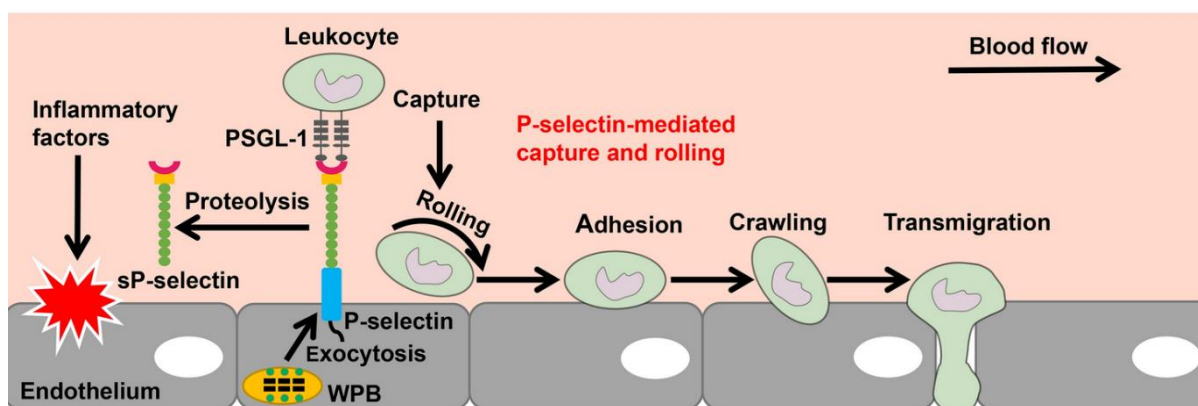


Figura 4 – A exposição do endotélio a fatores inflamatórios induz a exocitose dos WPB, resultando na translocação da P-selectina para a membrana plasmática das CEs e plaquetas. A P-selectina liga-se ao PSGL-1, mediando a captura e o rolamento dos leucócitos na corrente sanguínea e promovendo sua migração para os tecidos em processo inflamatório. Ling *et al.* (2023)

Além do papel na inflamação, a expressão de P-selectina foi associada à redução da massa muscular do gastrocnêmio em camundongos, por meio da regulação positiva dos níveis de MuRF-1, MAFbx e FOXO1 (Tan *et al.*, 2012b). A interação entre a P-selectina e seu ligante PSGL-1 induz a liberação de IL-8 pelos neutrófilos por meio da via ERK1/2. Os altos níveis de IL-8 aumentam a expressão de FOXO1, o que resulta na regulação positiva de MuRF-1 e MAFbx, gerando a atrofia muscular na caquexia associada ao câncer (Callaway *et al.*, 2019).

1.3.1. Citocinas como biomarcadores na caquexia

Conforme discutido anteriormente, as principais causas da caquexia do câncer envolvem alterações metabólicas que afetam múltiplos órgãos, levando à liberação de fatores de caquexia pelos tumores ou células hospedeiras (Figura 2). Esses fatores desempenham papel crucial na sinalização entre os órgãos, provocando distúrbios na comunicação intertecidual. Em resposta, os órgãos ou tecidos hospedeiros podem secretar diversos fatores de caquexia que podem tanto inibir quanto promover a progressão tumoral (Wang *et al.*, 2024). Embora o tecido adiposo não seja o primeiro tecido a ser degradado na perda de peso em pacientes oncológicos, ele possui papéis metabólicos (ao armazenar triglicerídeos) e endócrino importantes (ao secretar fatores sinalizadores - como as adipocinas, incluindo a adiponectina, resistina, leptina, TNF- α e IL-6) (Mattu e Randeva, 2013).

A adiponectina (ApN) é secretada principalmente pelos adipócitos na corrente sanguínea e, desempenha um papel crucial na sinalização entre o tecido adiposo branco e outros tecidos (Wang e Scherer, 2016). Os níveis de ApN circulantes são influenciados por uma variedade de fatores, incluindo fatores de transcrição, inflamatórios, ambientais, dietéticos e hormonais (Hotta *et al.*, 2000). Em relação ao dismorfismo sexual, foram observadas

concentrações de ApN mais elevadas em fêmeas em comparação com machos, tanto em roedores quanto em humanos saudáveis. Isso tem sido atribuído à ação da testosterona, que atua como um fator inibidor na produção ApN de alto peso molecular, que é a forma mais ativa disponível no plasma (Nishizawa *et al.*, 2002). Além disso, a expressão dos receptores de ApN no tecido muscular esquelético é diferente entre os sexos, sendo mais expressa nos homens, o que contribui para os níveis circulantes mais baixos da ApN em comparação as mulheres (Storgaard *et al.*, 2007).

Os níveis de ApN são inversamente proporcionais ao IMC e à adiposidade, podendo ser encontrados em baixos níveis em algumas condições patológicas, como a obesidade (Frankenberg, Von, Reis e Gerchman, 2017). Isso é atribuído ao estado inflamatório crônico induzido pela liberação de citocinas pró-inflamatórias pelo tecido adiposo (IL-6, IL-8, TNF- α) e pela leptina, os quais inibem a transcrição de ApN, resultando na diminuição dos níveis circulantes na obesidade (Parida, Siddharth e Sharma, 2019). Além disso, a redução dos níveis de ApN diminui a sensibilidade à insulina e a inserção de GLUT-4 na membrana celular, aumentando o risco de diabetes tipo 2 (Ceddia *et al.*, 2005; Parida, Siddharth e Sharma, 2019). Devido à relação inversa da ApN com o IMC e a adiposidade, pesquisas têm se concentrado na investigação da associação do aumento do seus níveis com a perda de peso e a caquexia associada ao câncer, principalmente em estágios mais avançados da doença (Cnop *et al.*, 2003; Mannelli *et al.*, 2020)

O Sistema Nervoso Central (SNC) também é afetado pela liberação de citocinas na corrente sanguínea (Tsai *et al.*, 2018). O fator de diferenciação de crescimento 15 (GDF-15), também conhecido como citocina 1 inibitória de macrófagos (MIC-1), é um membro da superfamília TGF- β , secretado em níveis elevados em resposta ao estresse celular, danos teciduais e por células tumorais (Tsai *et al.*, 2018). Após a liberação no plasma, o GDF-15 irá atuar na área postrema (AP) e no núcleo do trato solitário (NTS), ligando-se ao neuroreceptor GFRAL e formando o complexo GDF15/GFRAL com o correceptor RET. Em seguida, moléculas de sinalização intracelular - como a quinase regulada por sinal extracelular (Erk1/2), Akt e fosfolipase C-gama (PLC) - são fosforiladas, resultando na diminuição do apetite e da ingestão alimentar (Figura 5) (Ahmed *et al.*, 2021; Hsu *et al.*, 2017).

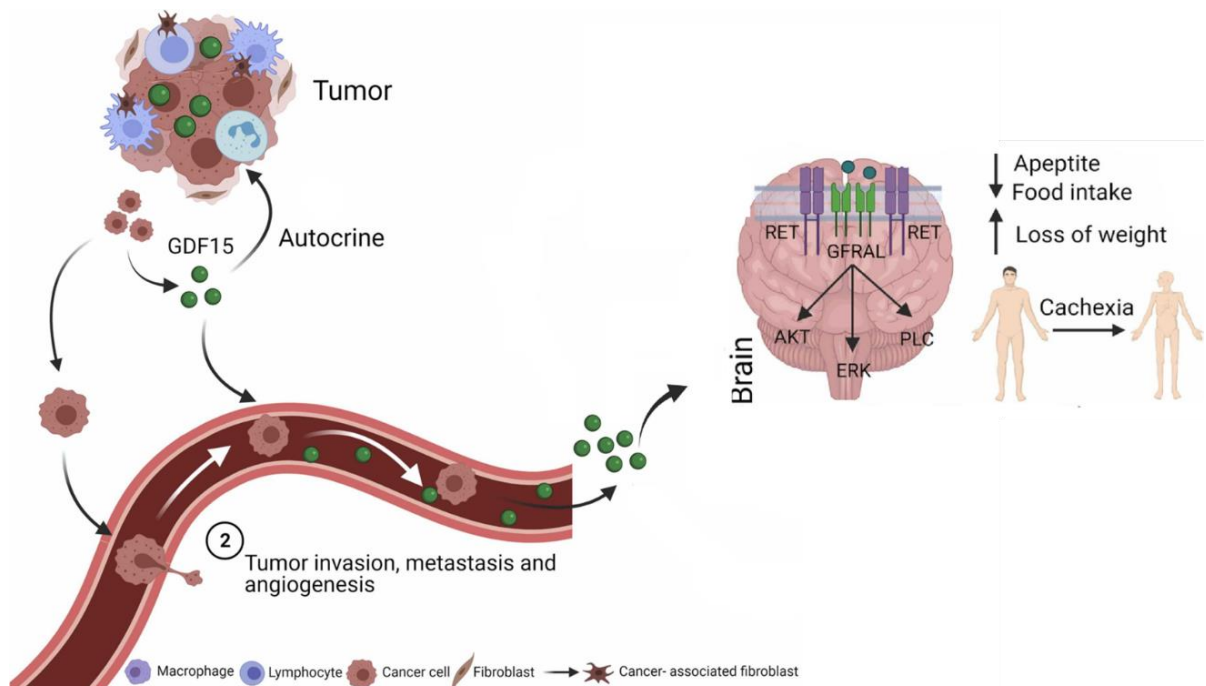


Figura 5 – Sinalização molecular do GDF-15 na caquexia. Após ser secretado pelo tumor, o GDF-15 irá atuar na AP e no NTS, se ligando ao neuroreceptor GFRAL e formando o complexo GDF15/GFRAL com o correceptor RET. Esse complexo ativa e fosforila as vias de sinalização Erk, Akt e PLC, levando à redução do apetite e da ingestão alimentar. Adaptada de Siddiqui *et al.* (2022).

Na caquexia, os estudos sugerem que o GDF-15 influencia indiretamente tanto a degradação da massa muscular esquelética quanto do tecido adiposo, devido ao déficit energético causado pela redução da ingestão alimentar e do apetite (anorexia) por meio da ação no SNC (Breit, Brown e Tsai, 2021). Os quimioterápicos à base de platina provocam efeitos colaterais como êmese e anorexia, e pesquisas estão explorando o papel do GDF-15 como causador desses sintomas (Breen *et al.*, 2020). Terapias à base de platina aumentam os níveis de GDF-15 em pacientes com carcinoma pulmonar de células não pequenas (NSCLC), câncer colorretal e câncer de ovário (Breen *et al.*, 2020). A inibição de GDF-com um anticorpo produzido em primatas não humanos reduziu a incidência de êmese após o tratamento com cisplatina, demonstrando a atuação da citocina como um dos possíveis causadores da êmese (Breen *et al.*, 2020). Com base nos aspectos exposto acima, pesquisas em modelos animais e em humanos buscam tratamentos para a caquexia baseados na inibição de GDF15/GFRAL (Kadokia, Hamilton-Reeves e Baracos, 2023; Suriben *et al.*, 2020).

2. HIPÓTESE

Portanto, considerando a dificuldade de prever quem desenvolverá perda de peso após o início da quimioterapia, a presente Dissertação de Mestrado testou a seguinte hipótese: pacientes brasileiros com CGI com perda de peso apresentam uma maior frequência de alelos de risco nos SNPs FOXO3 (rs1935949), FOXO3 (rs4946935), ACVR2B (rs2268757) e SELP (rs6136), bem como níveis elevados de ApN e GDF-15 em comparação com os grupos controle e sem perda de peso.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar os SNPs nos genes FOXO3, ACVR2B e SELP e os níveis de ApN e GDF-15 em pacientes brasileiros com câncer no trato gastrointestinal, considerando pacientes com perda e sem perda significativa de peso, bem como em indivíduos controles.

3.2. Objetivos Específicos

- 1- Avaliar a perda de peso dos pacientes com câncer no trato gastrointestinal após o início do tratamento quimioterápico;
- 2- Avaliar a relação entre os sinais e sintomas apresentados pelos pacientes com câncer no trato gastrointestinal durante a quimioterapia, por meio do Questionário de Avaliação Global e Alimentar do Paciente Oncológico, com a perda de peso;
- 3- Quantificar os níveis de ApN e GDF-15 no plasma dos pacientes com câncer no trato gastrointestinal (com perda e sem perda de peso) e indivíduos controles (ausência de câncer);
- 4- Genotipar os SNPs genes FOXO3 (rs1935949), FOXO3 (rs4946935), ACVR2B (rs2268757) e SELP (rs6136) em pacientes com câncer no trato gastrointestinal (com perda e sem perda de peso) e comparar com indivíduos controles.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Aprovação do Comitê de Ética

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa CEP-CONEP-Plataforma Brasil (Número do Parecer 5.968.150). O consentimento dos pacientes oncológicos com perda e sem perda e indivíduos controles em participar desta pesquisa foi obtido após a explicação e o detalhamento dos objetivos e dos procedimentos metodológicos. Os indivíduos que concordaram em participar assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (apêndices 2 e 3), garantindo o anonimato das informações fornecidas e a liberdade de deixar a pesquisa e a retirada do material biológico a qualquer momento.

4.2. Cálculo amostral da população de estudo

O cálculo amostral foi baseado no trabalho de Barbosa *et al.* (2012), outro trabalho populacional do grupo de pesquisa, que estudou polimorfismos presentes no gene que codifica a enzima cotelcol metil transferase em pacientes com fibromialgia.

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

onde: N – tamanho da amostra; $Z_{\alpha/2}$ – valor crítico para o grau de confiança desejado, usualmente: 1,96 (95%); δ – 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).

Cada grupo deveria consistir em $n = 76,8$ pacientes. No intuito de avaliar tanto a população oncológica quanto a saudável, a amostra do presente Projeto de Pesquisa foi dividida em três grupos distintos: pacientes oncológicos com perda de peso, pacientes oncológicos sem perda de peso e indivíduos saudáveis (Figura 6)

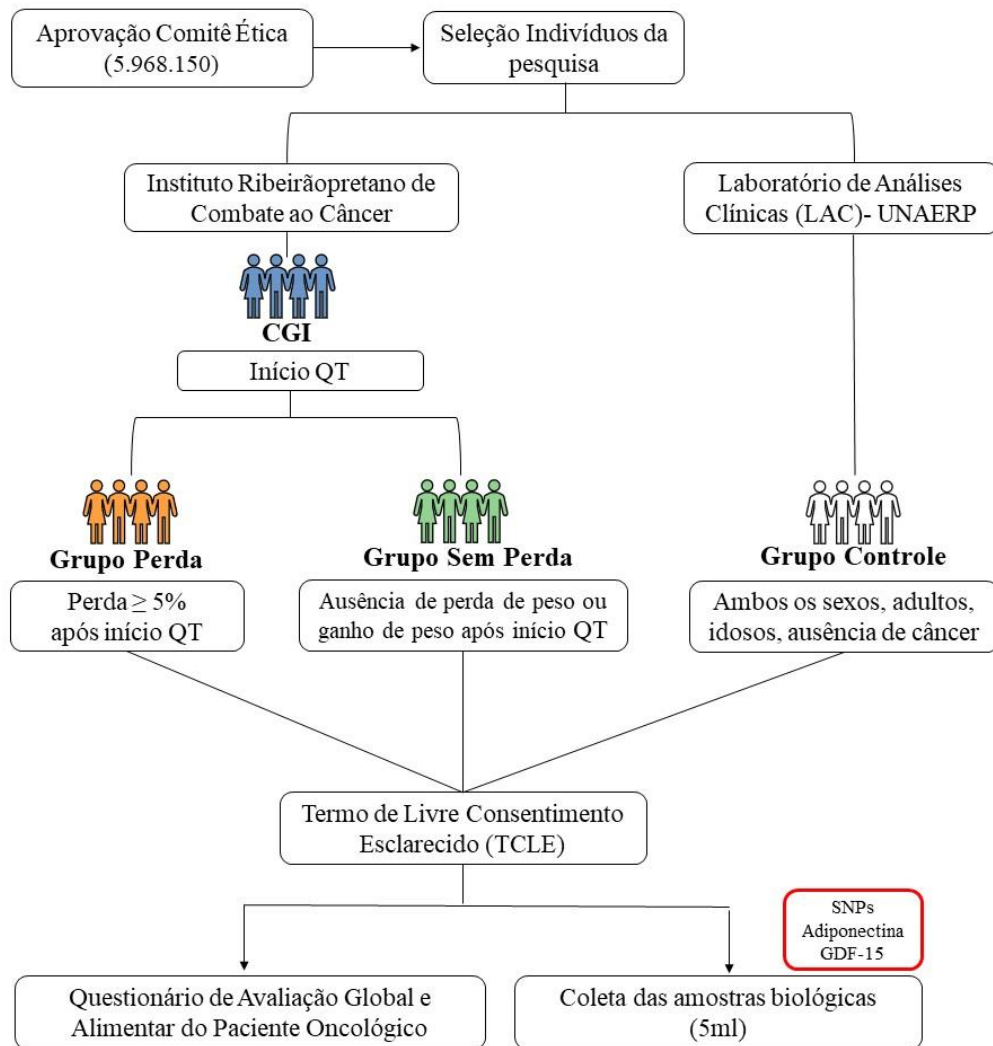


Figura 6 – Exemplificação da seleção dos indivíduos da pesquisa. No Instituto RibeirãoPretano de Combate ao Câncer foram selecionados os pacientes oncológicos com CGI, sendo aqueles com perda de peso $\geq 5\%$ após o início do tratamento quimioterápico (QT) agrupados ao Grupo Perda. Os pacientes que não apresentaram perda de peso $\geq 5\%$ ou que ganharam peso após o início do QT foram incluídos no Grupo Sem Perda. No Laboratório de Análises Clínicas (LAC)- UNAERP, foram coletados os indivíduos saudáveis (ausência de câncer) e agrupados no Grupo Controle. Todos os indivíduos assinaram o Termo de Livre Consentimento Esclarecido (TCLE), e responderam ao Questionário de Avaliação Global e Alimentar do Paciente Oncológico. Também foram coletadas amostras biológicas para futuras análises.

4.3. População de Estudo

4.3.1. Pacientes Oncológicos com perda de peso (Grupo Perda)

Após a aprovação do Comitê de Ética, a coleta dos pacientes oncológicos foi realizada sob supervisão do responsável Prof. Dr. Adilson Aparecido no Instituto Ribeirãopretano de Combate ao Câncer – RP (anexo 1).

Participaram desse estudo pacientes que atenderam aos seguintes critérios de inclusão: diagnóstico de CGI (esôfago, estômago, intestino delgado, cólon, fígado, pâncreas e reto), de

ambos os sexos, adultos (acima de 18 anos) e idosos (até 90 anos), com ou sem alterações metabólicas (doenças crônicas não transmissíveis), que já iniciaram o primeiro ciclo do QT, com ou sem radioterapia, e que apresentaram perda de peso $\geq 5\%$ nos seis meses após o início do tratamento anticâncer (Fearon *et al.* 2011). A seleção dos participantes do Grupo Perda ocorreu após a confirmação da perda de peso $\geq 5\%$ no prontuário médico dos pacientes oncológicos durante a quimioterapia.

Foram excluídos pacientes com idade inferior a 18 anos e acima de 90 anos, ausência de CGI, sem tratamento quimioterápico, perda de peso $< 5\%$ após o início tratamento anticâncer, ausência de exames bioquímicos, portadores de HIV e distúrbios autoimunes e ausência de histórico médico.

4.3.2. Pacientes Oncológicos sem perda de peso (Grupo Sem Perda)

Foi incluído indivíduos com CGI, ambos os sexos, adultos e idosos, com ou sem alterações metabólicas, que já haviam iniciado o primeiro ciclo do tratamento quimioterápico, com ou sem radioterapia, ausência de perda de peso/manutenção ou presença de ganho de peso ao dar início a quimioterapia. Foram excluídas pessoas com idade inferior a 18 anos e acima de 90 anos, ausência de CGI, ausência de QT, presença de perda de peso $\geq 5\%$ após o início do tratamento quimioterápico, ausência de exames bioquímicos, portadores de HIV e distúrbios autoimunes e ausência de histórico médico. A seleção dos participantes do Grupo Sem Perda foi realizada após confirmar a ausência de perda de peso ou o ganho de peso no prontuário médico dos pacientes oncológicos durante a quimioterapia.

4.3.3. Indivíduos com ausência de câncer (Grupo Controle)

As amostras biológicas foram coletadas no laboratório de análises clínicas (LAC) - UNAERP sob autorização da responsável Carla Denipotte Gallon Pitta (anexo 2). A seleção foi realizada baseada no pareamento com os pacientes oncológicos com perda de peso $\geq 5\%$ de acordo com o sexo e idade. Foram incluídos indivíduos de ambos os sexos, adultos e idosos, e excluiu-se indivíduos com presença de câncer ou histórico médico, portadores de HIV, distúrbios autoimunes, e indivíduos classificados com obesidade de acordo com o Índice de Massa Corporal.

4.4. Avaliação dos Parâmetros Clínicos e Antropométricos

Os dados de identificação (nome, idade, sexo, raça, naturalidade e estado civil), histórico oncológico (tipo de tumor, estágio, estadiamento, presença ou não de metástase, agentes

quimioterápicos, radioterapia e cirurgias) histórico patológico (medicamentos, doenças crônicas não transmissíveis, tabagismo, etilismo e outras patologias) e histórico familiar de câncer foram coletados do prontuário médico do Instituto Ribeirãopretano de Combate ao Câncer- Ribeirão Preto. Por meio do mesmo, foram coletados a altura e o peso do paciente no momento do diagnóstico e no momento do recrutamento do estudo para o cálculo do Índice de Massa Corporal (IMC) e avaliação do estado nutricional para adultos (18 a 60 anos) segundo a OMS (2000) e idosos (>60 anos) segundo OPAS (2001) (Tabela 1). As medidas antropométricas foram aferidas no momento da triagem médica pela equipe multiprofissional do próprio hospital a cada início do novo ciclo quimioterápico de cada paciente oncológico.

Tabela 1 – Classificação do estado nutricional em adultos e idosos através do Índice de Massa Corporal (IMC).

ADULTOS (OMS, 2000)	
IMC (kg/m²)	Classificação
<18,5	Magreza
18,5 a 24,9	Eutrofia
25,0 a 29,9	Sobrepeso
30,0 a 34,9	Obesidade grau I
35,0 a 39,9	Obesidade grau II
≥40	Obesidade grau III
IDOSOS (OPAS, 2001)	
IMC (kg/m²)	Classificação
<23	Magreza
23 a 28	Eutrofia
28 a 30	Sobrepeso
>30	Obesidade

Os pacientes recrutados foram entrevistados por meio do Questionário de Avaliação Global e Alimentar no Paciente Oncológico (APÊNDICE 1) baseado em um compilado de questões retiradas dos questionários: Consenso Brasileiro de Caquexia/Anorexia em Cuidados Paliativos (ABCP, 2011), Avaliação Subjetiva Global Produzida Pelo Paciente (ASG-PPP) (Gonzalez *et al.*, 2010), instrumento QLQ-C30 (Quality of Life Questionnaire) (Franceschini *et al.*, 2010) e miniCASCO (Argilés *et al.*, 2017). O questionário abrange perguntas envolvendo a performance física, qualidade de vida e sintomas gastrointestinais.

4.5. Procedimentos

4.5.1. Coleta e Processamento das Amostras

Foram coletados 5 mL de sangue periférico dos pacientes recrutados utilizando tubos BD Vacutainer (K2 EDTA (K2E) 7.2 mg Plus Blood Collection Tubes) e processadas no

Laboratório de Biologia Molecular- UNAERP, autorizado pelo coordenador da Unidade de Biotecnologia Mozart Marins (anexo 3). As amostras de sangue foram devidamente etiquetadas e transportadas em caixa térmica contendo gelo pôr no máximo 1 hora, conforme os requisitos da Diretoria Colegiada (RDC) 20/2014 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) e Portaria Conjunta Ministério da Saúde (MS)/Anvisa 370/2014. O sangue coletado foi centrifugado a 2000 g, por 5 minutos, a 23°C. Em seguida, foi realizada a separação do plasma sanguíneo, e as alíquotas de sangue e do plasma foram armazenadas em um freezer a -20°C e -80°C no Laboratório de Biologia Molecular - UNAERP para posteriores análises por um prazo de 1 ano.

4.5.2. Extração do DNA Genômico

A extração de DNA foi realizada pelo método de coluna por meio do kit ilustra Blood Genomic Prep Mini Spin (GE Healthcare, EUA), conforme especificado pelo fabricante. Para isso, em um tubo de 1,5 mL foram adicionados 200 µL das amostras de sangue e 20 µL de proteinase K. Adicionou-se 400 µL de *Lysis Buffer type* e as amostras foram levadas ao vórtex por 15 segundos e incubados em temperatura ambiente por 10 minutos. O conteúdo foi transferido para a coluna com um tubo coletor presente no kit do fabricante, sendo posteriormente centrifugado a 11.000 RCT (11.000 g) por 2 minutos a 21°C. Descartou-se o resíduo do tubo coletor e adicionou-se na coluna 500 µL de *Lysis Buffer type* e novamente foi centrifugado a 11.000 RCT por 2 minutos a 21°C.

O conteúdo do tubo coletor foi descartado e, em seguida, foi adicionado 500 µL de *Wash Buffer type*. O tubo foi centrifugado a 11.000 RCT por 3 minutos a 21°C. Novamente foi realizado o descarte do conteúdo do tubo coletor e centrifugado a 11.000 RCT por 1 minutos a 21°C. Foi feita a troca do tubo coletor por um novo e adicionados 50 µL de *Elution Buffer type* pré-aquecido a 70°C. As amostras foram incubadas em temperatura ambiente por 1 minuto, centrifugadas a 11.000 RCT (11000g) por 1,5 minutos a 21°C e foi adicionado 20 µL de *Elution Buffer type*. Em seguida, o tubo foi centrifugado a 11.000 RCT por 1,5 minutos a 21°C para a coleta do material genético.

4.5.3. Quantificação do DNA Genômico

Para determinar a qualidade e quantidade de DNA, uma alíquota de cada amostra (1µL) foi quantificada por meio da leitura de absorbância utilizando o espectrofotômetro NanoDrop Lite (ThermoFisher Scientific), com o comprimento de onda igual a 260nm. A pureza do DNA foi verificada pela leitura a 280nm, para detecção de eventuais contaminações da amostra por

proteínas. O material foi considerado puro quando as relações entre as densidades ópticas (A260/A280) foi maior que 1.7 a 1.9, de acordo com a especificação do fabricante [ilustra Blood Genomic Prep Mini Spin (GE Healthcare)].

4.5.4. Genotipagem dos Polimorfismos

A genotipagem foi realizada por meio do método PCR quantitativo em colaboração com o Dr. Dante Gavio, proprietário da empresa de testes genéticos DGLab®, na Supera Parque. Para isso, foi utilizado o kit Genotyping Master Mix® e sondas TaqMan® (Thermo Fisher Scientific) FOXO3 (rs1935949), FOXO3 (rs4946935), ACVR2B (rs2268757) e SELP (rs6136) (Tabela 2) (Johns *et al.*, 2017; Sobieszek *et al.*, 2021). A reação foi realizada em um volume final de 25 µL em tiras de tubo de PCR (PCR tube strips), contendo 12,5 µL de Taqman Genotyping Master Mix®, 1,25 µL de ensaio Taqman SNP® (20×) e 10,25 µL de água DNA-free e 1 µL de DNA, conforme demonstrado na Tabela 3. A Região no genoma humano em que foram identificados a presença dos SNPs estudados está disponível no Anexo 4.

Tabela 2 – Alelos mutantes e selvagens dos SNPs nos genes FOXO3, ACVR2B e SELP e localização gênica.

Gene	Reference SNP	Alelo Mutante	Alelo Selvagem	Localização gênica
FOXO3	rs1935949	GG/GA	AA	Íntron
	rs4946935	AA/AG	GG	Íntron
ACVR2B	rs2268757	CC/CT	TT	Íntron
SELP	rs6136	GG/GT	TT	Éxon

Fonte: Adaptado de NCBI.

Tabela 3- Concentrações de reagentes para a reação de PCR quantitativa.

Reagentes	Volume
TaqMan Genotyping Master Mix	12,5 µL
TaqMan SNP Genotyping Assays (20×)	1,25 µL
Água DNA-free	10,25 µL

O protocolo de ativação enzimática por meio de ciclagem térmica foi: 40 ciclos de ativação enzimática a 95°C por 10 minutos, desnaturação a 95°C por 15 segundos e anelamento a 60°C por 1 minuto, conforme a Tabela 4. Todos os ensaios foram realizados em triplicada por sistema PCR quantitativo utilizando Mx3300 qPCR System (Stratagene, San Diego, CA, USA).

Tabela 4- Parâmetros de ciclagem para a reação.

Etapas	Temperatura (°C)	Tempo	Ciclos
Ativação enzimática	95	10 minutos	HOLD
Desnaturação	95	15 segundos	40
Anelamento/Extensão	60	1 minuto	40

4.5.5. Quantificação da ApN

A quantificação foi realizada a partir do plasma, utilizando o método de Ensaio de imun absorção enzimática (ELISA) por meio do kit Human ADIPOQ / Adiponectin (Sigma Aldrich, EUA). O kit foi armazenado a -20°C , as amostras foram separadas em duplicata e, para uso dos reagentes e do plasma, foram descongeladas em temperatura ambiente conforme as instruções do fabricante.

O plasma foi diluído em 5 vezes utilizando o Diluente B (Sigma Aldrich), e em seguida, foi realizada a diluição do *Standard* [50 ng/mL] conforme a figura 7.

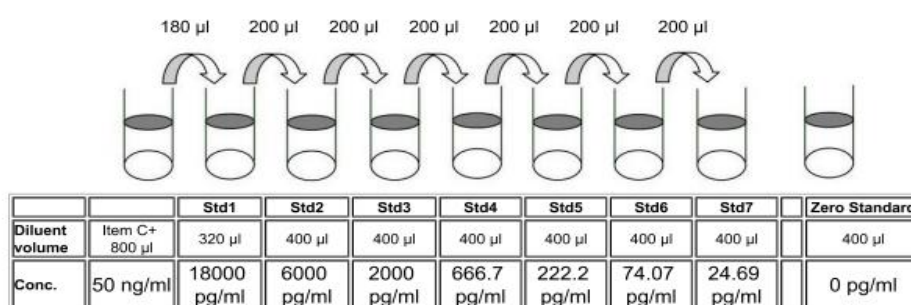


Figura 7 – Diluição do *Standard* conforme o protocolo do fabricante do kit ELISA Human ADIPOQ / Adiponectin (Sigma Aldrich). Adaptado de Protocolo kit ELISA Human ADIPOQ / Adiponectin (Sigma Aldrich).

Em uma placa de 96 poços, foram adicionados 100 µL do *Standard* e 100 µL do plasma, e as amostras foram incubadas por 2 horas e 30 minutos em temperatura ambiente. A placa foi lavada 4 vezes com 200 µL de *Wash Buffer* e foram adicionados 100 µL do anticorpo de detecção, e mantido em agitação por 1 hora em temperatura ambiente. A lavagem foi realizada novamente com *Wash Buffer* e foi adicionado 100 µL de HRP- *streptavidin* e agitado por 45 minutos. Adicionou-se 100 µL do reagente TMB e a placa foi incubada em temperatura ambiente por 30 minutos. Por fim, foi colocado 50 µL de *Stop solution* e a leitura da placa foi realizada em um leitor universal de microplacas (Multiskan FC Thermo scientific) em um comprimento de onda de 450nm.

4.5.6. Quantificação de GDF-15

A quantificação foi feita a partir do plasma das amostras de sangue obtidas dos indivíduos selecionados utilizando o método de Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) por meio do kit ELISA human GDF-15/MIC-1 (Sigma Aldrich). A quantificação foi realizada em duplicata conforme recomendações do fabricante. Inicialmente os reagentes e o plasma foram descongelados em temperatura ambiente e em seguida, foi realizada a diluição do plasma em 5 vezes em diluente e do *Standard* (padrão) [50pg/mL] (Figura 8).

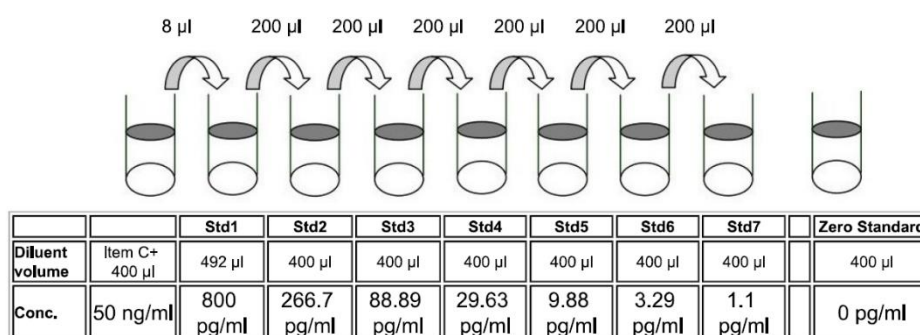


Figura 8 - Diluição do *Standard* conforme o protocolo do fabricante do kit ELISA human GDF-15/MIC-1 (Sigma Aldrich). Adaptado de Protocolo kit ELISA human GDF-15/MIC-1 (Sigma Aldrich).

Em uma placa de 96 poços, foram adicionados 100 µL do *Standard* e 50 µL do plasma, incubando por 2 horas e 30 minutos em temperatura ambiente, seguido de lavagem com 200µL de *Wash Buffer*. Posteriormente, foram adicionados 100 µL do anticorpo de detecção e incubado por 1 hora com agitação, também em temperatura ambiente. Procedeu-se novamente com a lavagem com *Wash Buffer*. Em seguida, foram adicionados 100 µL de HRP- *streptavidin* e a placa foi incubada em temperatura ambiente por 45 minutos. Após a lavagem, foi adicionado 100 µL do reagente TMB e a placa foi incubada por mais 30 minutos em temperatura ambiente. Por fim, adicionou-se 50 µL de *Stop solution* e a leitura da placa foi realizada em um leitor universal de microplacas (Multiskan FC Thermo scientific) em um comprimento de onda de 450nm.

4.6. Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram feitas utilizando o software GraphPad Prism Versão 9.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão, e as variáveis categóricas foram expressas em números e porcentagens. Para a análise dos dados paramétricos foi realizado o teste *t Student*, enquanto para comparações múltiplas, o *one-way ANOVA* seguido do teste *post-hoc de Bonferroni*.

Os dados não paramétricos foram analisados com o teste *Mann-Whitney* e para múltiplas comparações o teste *Kruskal-Wallis* seguido do *post hoc Dunn's*. Análise de correlação para determinar a relação entre duas variáveis contínuas foi realizada por meio do teste de Correlação de *Spearman*. Diferenças nas frequências genotípicas foram avaliadas pelo teste *exato de Fisher* e o teste qui-quadrado (χ^2). Valores de $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos.

5. RESULTADOS

5.1. Caracterização da população de estudo

Um total de 3800 pacientes passaram por triagem no centro oncológico e apenas 125 indivíduos atenderam os critérios de inclusão deste estudo, distribuídos da seguinte forma (Tabela 5): n=49 no Grupo Perda, composto por pacientes com CGI e perda de peso $\geq 5\%$; n=25 no Grupo Sem Perda, composto por pacientes com CGI e ausência de perda de peso ($< 5\%$) ou com ganho de peso; e n=51 no Grupo Controle, indivíduos sem câncer.

Tabela 5 - Pacientes e indivíduos incluídos no estudo.

	Critério de inclusão	Local do recrutamento
Grupo Perda n=49	Diagnóstico de câncer gastrointestinal com perda ($\geq 5\%$) durante o tratamento quimioterápico.	Instituto de Ribeirão Preto de Combate ao Câncer em Ribeirão Preto/SP
Grupo Sem Perda n=25	Diagnóstico de câncer gastrointestinal ausência de perda de peso ($< 5\%$) ou presença de ganho de peso durante o tratamento quimioterápico.	Instituto de Ribeirão Preto de Combate ao Câncer em Ribeirão Preto/SP
Grupo Controle n=51	Ausência de câncer.	Laboratório de Análises Clínicas UNAERP em Ribeirão Preto/SP

No Grupo Perda (n=49), a média de idade foi de 62 ± 11 anos, sendo n=27 (55,1%) do sexo masculino e n=22 (44,89%) feminino (Tabela 6). Todos os pacientes foram diagnosticados com CGI, com as seguintes localizações tumorais: n=19 (38,77%) cólon, n=17 (34,69%) reto, n=8 (16,32%) gástrico, n=3 (6,12%) esôfago e n=2 (4,08%) pâncreas. Além disso, n=33 (67,34%) apresentaram metástase, sendo n=13 (26,53%) pulmonar, n= 10 (20,40%) hepática, n=4 (8,16%) nos ovários, n=4 (8,16%) linfonodos, n=1 (2,04) óssea e n=1 (2,04) tireoide. Do total de pacientes, n=35 (71,42%) já haviam passado por alguma intervenção cirúrgica até o momento do recrutamento. Os dois protocolos quimioterápicos mais utilizados no tratamento foram n=33 (67,34%) mFLOX e n=8 (16,32%) Mayo Clinic.

O Grupo Sem Perda (n=25), apresentou uma média de idade de 61 ± 9 anos e era composto por n=13 (52%) indivíduos do sexo masculino e n=12 (48%) do sexo feminino. Também apresentaram o diagnóstico de CGI, sendo n=18 (72%) cólon e n=7 (28%) reto. Apenas n=9 (36%) tinham câncer metastático, dos quais eram n=3 (12%) pulmonar, n=4 (16%) hepática, n=2 (8%) linfonodos e n=2 (8%) óssea. Entre os 25 pacientes sem perda, n=20 (80%) passaram por intervenção cirúrgica até o momento do recrutamento, sendo o protocolo quimioterápico mais comum o n=16 (64%) mFLOX.

Tabela 6 - Características clínicas dos pacientes do Grupo Perda (n=49) e Grupo Sem Perda (n=25).

	Grupo Perda	Grupo Sem Perda	Controle
Idade (anos)	62 ± 12	61 ± 9	50 ± 10
Sexo	n (%)	n (%)	n (%)
Feminino	22 (44,89)	12 (48)	27 (53)
Masculino	27 (55,1)	13(52)	23 (45)
Comorbidades			
Presença	24 (48,79)	17 (68)	-
Ausência	25 (51,02)	8 (32)	-
Local do tumor			
Esôfago	3 (6,12)	-	-
Gástrico	8 (16,32)	-	-
Pâncreas	2 (4,08)	-	-
Cólon	19 (38,77)	18 (72)	-
Reto	17 (34,69)	7 (28)	-
Metástase	33 (67,34)	9 (36)	-
Pulmonar	13 (26,53)	3 (12)	-
Hepática	10 (20,40)	4 (16)	-
Ovário	4 (8,16)	-	-
Linfonodos	4(8,16)	2 (8)	-
Óssea	1(2,04)	2 (8)	-
Tireoide	1 (2,04)	-	-
Cirurgia	35 (71,42)	20 (80)	-
Protocolos quimioterápicos			
mFLOX ^a	33 (67,34)	16 (64)	-
Mayo Clinic ^b	8 (16,32)	6 (24)	-
FOLFOX ^c	3 (6,12)	3 (12)	-
Folfirinox ^d	1 (2,04)	-	-
Carboplatina + paclitaxel	1 (2,04)	-	-
Carboplatina + taxol	2 (4,08)	-	-
Gencitabina monodroga	1 (2,04)	-	-

^a Oxaplatina, 5-Fluouracil e leucovorin.

^b 5-Fluouracil e leucovorin.

^c Oxaplatina, 5-Fluouracil e leucovorin.

^d Ácido fólico, Fluorouracila, Irinotecano e Oxaplatina.

- : ausência de dados.

5.2. Avaliação da Perda de Peso

A média do peso e do IMC de ambos os grupos oncológicos foram calculados no momento do diagnóstico (Before) e após a quimioterapia (After) e observou-se uma perda de peso e mudança no IMC significativa no Grupo Perda {(perda de peso: 74.6 ± 17.42 vs 61.19 ± 15.25 kg; p<0.0001) (IMC: 27.02 ± 5.61 vs 21.88 ± 4.96 kg/m²; p<0.0001, respectivamente; Figura 5, painéis A e B)}. Em contraste, no Grupo Sem Perda, foram observados ganhos significativos de peso e alterações no IMC {(perda de peso: 70.55 ± 11.39 vs 74.17 ± 11.14 kg;

$p=0.003$) (IMC: 26.32 ± 3.39 vs 27.85 ± 4.26 kg/m², respectivamente; $p=0.003$; Figura 9, painéis C e D)}.

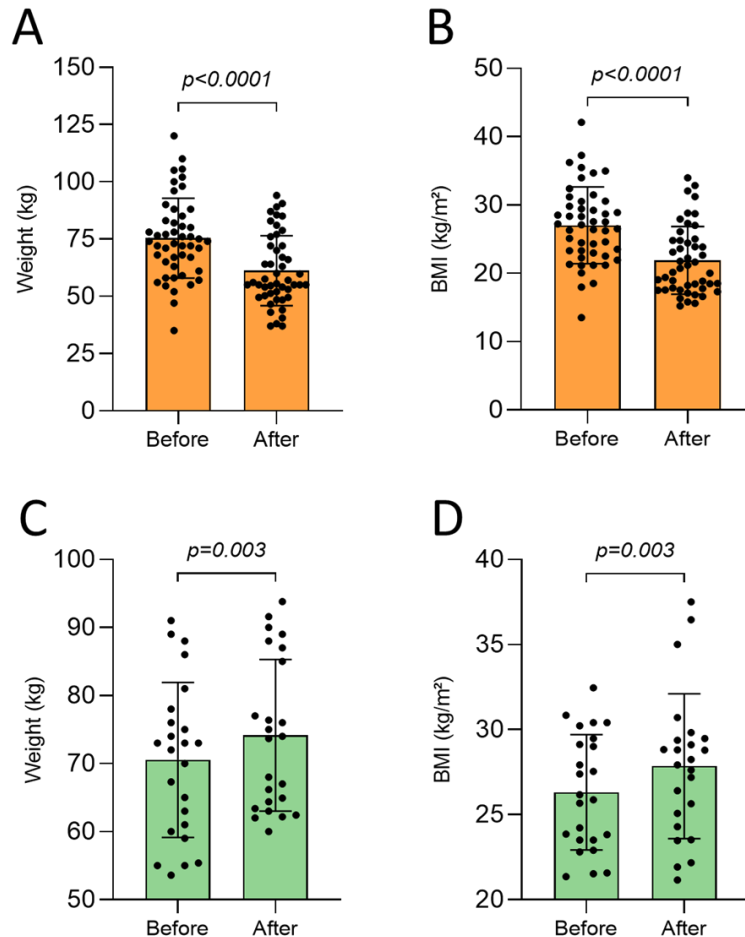


Figura 9 - Média do peso (kg) e do IMC (kg/m²) no momento do diagnóstico oncológico (Before) e no momento do recrutamento (After) do Grupo Perda (A e B) (n=49) e do Grupo Sem Perda (C e D) (n=25). Teste Wilcoxon

Ao analisar as classificações do estado nutricional com base no IMC, foi observado que no momento do diagnóstico (Inicial) a maioria dos pacientes do Grupo Perda foram classificados como eutróficos n=16 (32,65%), seguidos de sobrepeso n=12 (24,49%) e obesidade n=12 (24,49%) (Tabela 7). No entanto, ao longo do tratamento (Final), houve mudança na classificação com maior proporção de magreza n=25 (51,02%) e eutrofia n=12 (24,49%). No Grupo Sem Perda, no momento do diagnóstico, a maioria dos pacientes foram classificados com eutrofia n=12 (48%) e com sobrepeso n=6 (24%). Após iniciar a quimioterapia, uma maior proporção com sobrepeso n=11 (44%) e eutróficos n= 8 (32%) foram observados.

Tabela 7 - Classificação do estado nutricional de acordo com o Índice de Massa Corporal (IMC) no momento do diagnóstico (Inicial) e no momento do recrutamento (Final) do Grupo Perda (n=49) e do Grupo Sem Perda (n=25). Teste χ^2 .

Classificações	Grupo Perda Inicial n (%)	Grupo Perda Final n (%)	Valor P	Grupo Sem Perda Inicial n (%)	Grupo Sem Perda Final n (%)	Valor P
Magreza	9 (18,37)	25 (51,02)	<0.0001	2 (8,00)	2 (8,00)	0.02
Eutrofia	16 (32,65)	12 (24,49)		12 (48,00)	8 (32,00)	
Sobrepeso	12 (24,49)	8 (16,33)		6 (24,00)	11 (44,00)	
Obesidade	12 (24,49)	4 (8,16)		4 (16,00)	4 (16,00)	

5.3. Avaliação dos Sinais e Sintomas

Os sinais e sintomas dos indivíduos foram coletados por meio do Questionário de Avaliação Global e Alimentar do Paciente Oncológico após terem iniciado a quimioterapia (Tabela 8). Os pacientes com perda de peso apresentaram frequência significativa dos seguintes sintomas e sinais em comparação aos pacientes sem alterações no peso: cansaço, anorexia, dor, xerostomia, diarreia, disfagia, vômito e odores nauseantes ($p < 0.0001$, $p < 0.0001$, $p = 0.005$, $p = 0.01$, $p = 0.04$, $p < 0.0001$, $p < 0.0001$ e $p < 0.0001$, respectivamente; Tabela 8).

Tabela 8 - Sinais e sintomas relatados pelo Grupo Perda (n=49) e Grupo Sem Perda (n=25) após o início do tratamento anticâncer. Teste χ^2 em * $p \leq 0.05$.

Sinais e sintomas	Grupo Perda n (%)	Grupo Sem Perda n (%)	Valor P
Cansaço	24 (48,98)	6 (24,00)	<0.0001*
Náusea	21 (42,86)	8 (32,00)	0.14
Anorexia	20 (40,82)	3 (12,00)	<0.0001*
Dor	19 (38,78)	5 (20,00)	0.005*
Xerostomia	15 (30,61)	4 (16,00)	0.01*
Diarreia	14 (28,57)	4 (16,00)	0.04*
Disfagia	13 (26,53)	1 (4,00)	<0.0001*
Vômito	12 (24,49)	1 (4,00)	<0.0001*
Odores nauseantes	12 (24,49)	1 (4,00)	<0.0001*
Constipação	9 (18,37)	4 (16,00)	0.85
Alimentos com gosto estranho na boca	9 (18,37)	5 (20,00)	0.85
Fadiga	9 (18,37)	5 (20,00)	0.85
Dificuldade ao andar	7 (14,29)	3 (12,00)	0.83
Fraqueza	6 (12,24)	1 (4,00)	0.06
Pirose	2 (4,08)	0 (0,00)	0.12
Mastite	2 (4,08)	1 (4,00)	>0,9999
Dispneia	2 (4,08)	0 (0,00)	0.12

5.4. Polimorfismos de Nucleotídeo Único

Para a avaliação dos SNPs, foi analisado as frequências dos alelos de risco dos SNPs nos genes FOXO3, SELP e ACVR2B, não observando uma associação dos polimorfismos entre os pacientes com CGI e o Grupo Controle ($p=0.09$, $p=0.28$, $p=0.07$ e $p=0.71$, respectivamente; Tabela 9).

Tabela 9 – Genes com variantes significativamente associadas à perda de peso comparando Grupo Controle e Grupo Câncer (com e sem perda de peso). Teste *exato de Fisher*.

Gene	SNP	Risk allele	OR (95% CI)	p-Value
FOXO3	rs1935949	G	1.86 (0.94-3,69)	0.09
FOXO3	rs4946935	A	1.44 (0.79-2.57)	0.28
ACVR2B	rs2268757	C	0.44 (0.20-1.00)	0.07
SELP	rs6136	G	1.23 (0.61- 2.55)	0.71

Adicionalmente, foi realizado as análises dos SNPs comparando os Grupos Controle e Perda (Tabela 10). Não observando nenhuma associação significativa entre os SNPs nos genes FOXO3, ACVR2B e SELP com a perda de peso ($p=0.06$, $p=0.28$, $p=0.38$ e $p=0.85$, respectivamente; Tabela 11). No entanto, ao comparar os alelos de risco entre o Grupo Sem Perda e Perda, apenas o SNP rs2268757 no gene ACVR2B foi associado ao fenótipo da perda de peso em pacientes com CGI ($p=0.004$; Tabela 11).

Tabela 10 – Genes com variantes significativamente associadas à perda de peso comparando os Grupos Controle e Perda. Teste *exato de Fisher*.

Gene	SNP	Risk allele	OR (95% CI)	p-Value
FOXO3	rs1935949	G	1.99 (1,00-3,84)	0.06
FOXO3	rs4946935	A	1.44 (0.79-2.57)	0.28
ACVR2B	rs2268757	C	0.65 (0.27-1.54)	0.38
SELP	rs6136	G	1.15 (0.56-2.42)	0.85

Tabela 11 – Genes com variantes significativamente associadas à perda de peso comparando os Grupos Perda e Grupo Ganho. Teste *exato de Fisher* em $*p \leq 0.05$.

Gene	SNP	Risk allele	OR (95% CI)	p-Value
FOXO3	rs1935949	G	0.81 (0.40-1.71)	0.71
FOXO3	rs4946935	A	0.95 (0.52-1.72)	>0.99
ACVR2B	rs2268757	C	2.75 (1.33-5.70)	0.004*
SELP	rs6136	G	0.87 (0.44-1.81)	0.85

5.5. Quantificação da ApN

Após a quantificação, foi observado que os pacientes com CGI apresentam níveis elevados de ApN em comparação com o Grupo Controle (2067 ± 1246 vs 2618 ± 1355 pg/mL; $p=0.01$, Figura 10).

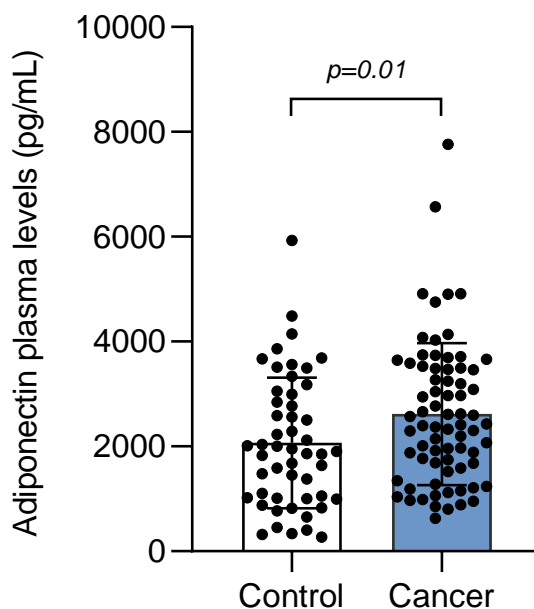


Figura 10 – Níveis plasmáticos de ApN entre o Grupo Controle (n=51) e os pacientes com CGI (n=73). Teste *Mann-Whitney*.

Em seguida, ao comparar os níveis plasmáticos de ApN entre os Grupos Controle, Perda e Sem Perda, foi observado que o Grupo Perda apresentou concentrações significativamente mais elevadas em comparação com o Grupo Controle e Sem Perda $\{(2067 \pm 1246$ vs 2911 ± 1418 ; $p=0.004)$ (2021 ± 996 vs 2911 ± 1418 pg/mL; $p=0.01$, respectivamente; Figura 11, painel A)}. Não foi encontrada diferença nos níveis de ApN entre o Grupo Controle e Sem Perda (2067 ± 1246 vs 2021 ± 996 pg/mL; $p>0.99$; Figura 11, painel A).

Ao comparar com o sexo masculino, os homens com perda de peso apresentaram níveis elevados de ApN em comparação aos controles (1660 ± 1307 vs 2660 ± 1036 ; $p=0.01$; Figura 11, painel B). Assim como ao analisar o sexo feminino, níveis elevados de ApN foram encontrados nos indivíduos com perda de peso em relação ao Grupo Controle e Sem Perda $\{(2376 \pm 1124$ vs 3245 ± 1779 ; $p=0.04)$ (1988 ± 995 vs 3245 ± 1779 pg/mL; $p=0.01$, respectivamente; Figura 11, painel B)}.

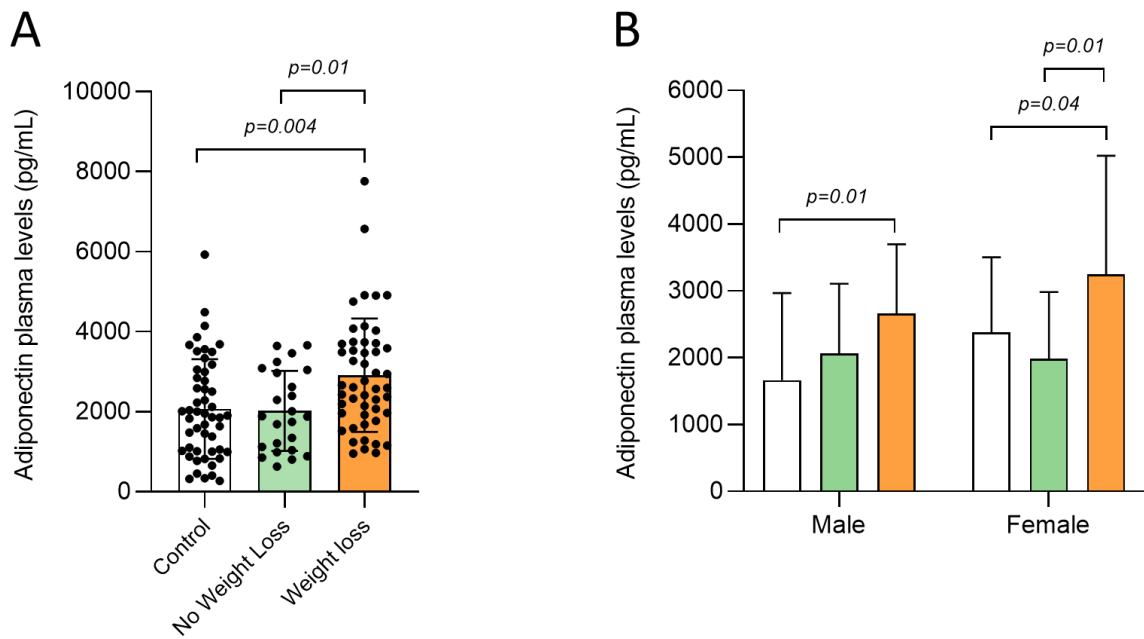


Figura 11 – Níveis plasmáticos de ApN entre os Grupo Controle (n=51), Grupo Sem Perda (n=24) e Grupo Perda (n=49) (A). Níveis plasmáticos de ApN entre os três grupos em comparação com o sexo masculino e feminino (B). Teste *Kruskal-Wallis* e *two-way ANOVA*.

Foi realizado a Correlação de *Spearman* para avaliar a associação da ApN com a porcentagem de perda de peso durante o período do tratamento, observando uma correlação fraca entre os níveis plasmáticos de ApN e a perda de peso após início do tratamento quimioterápico ($p=0.58$, $r=0.07$; Figura 12).

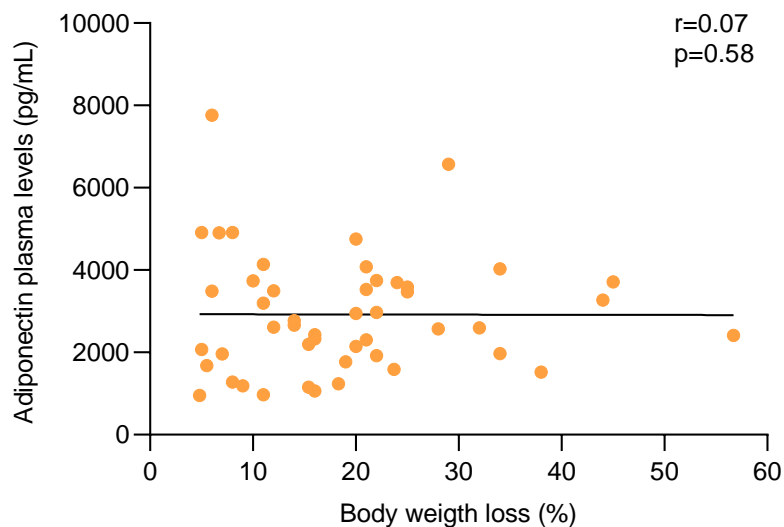


Figura 12 – Correlação entre os níveis plasmáticos de ApN e a porcentagem de perda de peso após o primeiro ciclo do tratamento quimioterápico (n=49). Correlação de *Spearman*.

5.6. Quantificação de GDF-15

Primeiro, avaliamos os níveis plasmáticos de GDF-15 comparando os indivíduos controles e os pacientes diagnosticados com CGI, observando que os pacientes oncológicos apresentam níveis elevados de GDF-15 (335 ± 176 vs 453 ± 190 pg/mL; $p < 0.0001$; Figura 13).

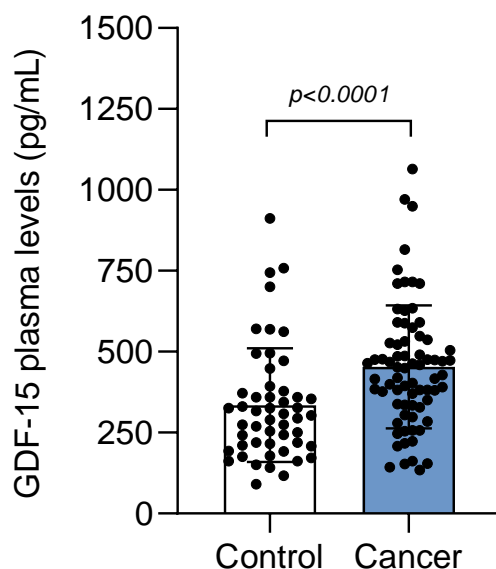


Figura 13 – Níveis plasmáticos de GDF-15 em indivíduos controles (n=51) e pacientes diagnosticados com CGI (n=73). Teste *Mann-Whitney*.

Posteriormente, os níveis de GDF-15 foram avaliados nos três grupos estudados, demonstrando que os pacientes oncológicos com perda de peso apresentam níveis elevados de GDF-15 em comparação com o Grupo Controle e o Grupo Sem Perda (335 ± 176 vs 506 ± 190 ; $p < 0.0001$) (350 ± 146 vs 506 ± 190 pg/mL; $p = 0.01$, respectivamente; Figura 14, painel A).

Ao realizar análises comparativas entre os sexos, foi demonstrado que homens do Grupo Perda apresentaram níveis elevados de GDF-15 em relação ao Grupo Controle (375 ± 199 vs 555 ± 208 pg/mL; $p = 0.002$; Figura 14, painel B). Da mesma forma, as mulheres do Grupo Perda também apresentaram níveis elevados em comparação ao Grupo Controle, bem como em relação àquelas que não apresentaram perda de peso durante o tratamento quimioterápico (274 ± 110 vs 444 ± 145 ; $p = 0.007$) (264 ± 99 vs 444 ± 145 pg/mL; $p = 0.002$, respectivamente; Figura 14, painel B).

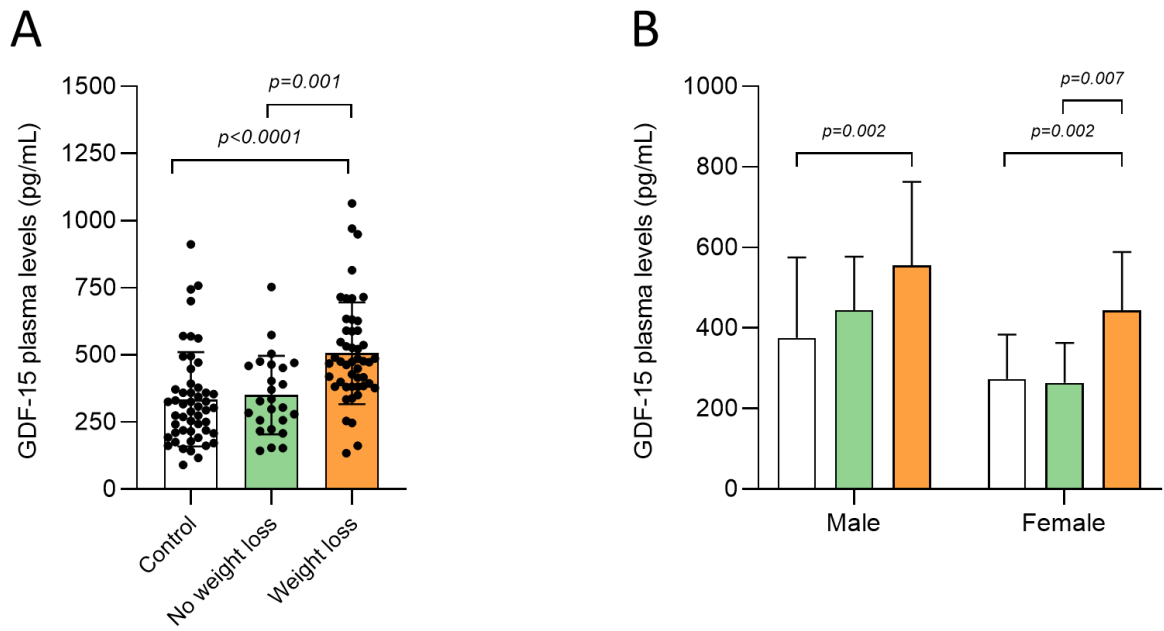


Figura 14 – Níveis plasmáticos de GDF-15 entre os Grupos Controle (n=51), Sem Perda (n=25) e Perda (n=48) (A). Níveis plasmáticos de GDF-15 entre os três grupos em comparação com o sexo masculino e feminino (B). Teste *Kruskal-Wallis* e *two-way ANOVA*.

6. DISCUSSÃO

Atualmente, a estratégia eficaz de manejo e reversão da caquexia associada ao câncer é a redução do tumor e o tratamento do câncer subjacente (Weber, Arabaci e Kir, 2022). Ainda não se conhece a prevalência e a progressão da perda de peso pré-diagnóstico, bem como o impacto do tratamento quimioterápico e da progressão do câncer na perda de peso (Gilmore *et al.*, 2022). À medida que a perda de peso avança nos pacientes oncológicos, menor é a resposta as intervenções farmacológicas e nutricionais, diminuindo a capacidade de responder contra infecções e de resistir ao tratamento, afetando negativamente o tecido adiposo e muscular, e reduzindo o bem-estar emocional e social do paciente (Dhanapal, Saraswathi e Govind Rajkumar, 2011; Sadeghi *et al.*, 2018). Após as análises dos 125 indivíduos recrutados, foi observado que pacientes com CGI com perda de peso apresentam maior frequência de sinais e sintomas adversos durante a quimioterapia e níveis elevados de ApN e GDF-15 em relação aos grupos Controles e Sem Perda. Além disso, o SNP rs2268757 no gene ACVR2B foi associado ao fenótipo da perda de peso durante a quimioterapia em pacientes com CGI.

6.1. Os agentes quimioterápicos na etiologia da perda de peso

Ao iniciar a quimioterapia, observou-se que os indivíduos do Grupo Perda apresentaram redução significativa de peso e mudança do estado nutricional para eutrofia e magreza. Por outro lado, os indivíduos do Grupo Sem Perda apresentaram ganho de peso significativo e mudança no estado nutricional para sobrepeso e eutrofia. Porém, o índice de Massa Corporal pode não representar com precisão as mudanças corporais específicas do tecido adiposo e muscular dos indivíduos quando comparado a métodos mais precisos, tais como análise de bioimpedância, absorciometria de raios X de dupla energia, tomografia computadorizada, ressonância magnética, ressonância magnética quantitativa, imagem de tomografia computadorizada quantitativa e ultrassom (Prado e Heymsfield, 2014). É importante ressaltar, entretanto, que o acesso a esses métodos de medição da composição corporal no Sistema Único de Saúde no Brasil é limitado para indivíduos oncológicos, dificultando a distinção entre perda de tecido muscular e adiposo, bem como o diagnóstico de síndromes, como a caquexia associada ao câncer.

Além do desafio do diagnóstico da perda de peso, os profissionais da saúde enfrentam hoje um novo problema: o excesso de peso corporal está cada vez mais presente nos pacientes oncológicos, não excluindo a presença de caquexia ou sarcopenia, podendo dificultar o seu diagnóstico (Prado *et al.*, 2008; Prado e Heymsfield, 2014).

Adicionalmente, os dados obtidos pela avaliação do questionário demonstraram que o Grupo Perda teve uma maior prevalência de cansaço, anorexia, dor, xerostomia, diarreia, disfagia, vômito e odores nauseantes em comparação ao Grupo Sem Perda. Essa maior prevalência pode ser um dos fatores contribuintes para a perda de peso durante o tratamento.

As drogas quimioterápicas podem prejudicar o estado nutricional por meio dos efeitos adversos, tais como alterações no paladar e olfato, aversões alimentares, saciedade precoce, anorexia, mucosite e prisão de ventre, contribuindo para o desenvolvimento da caquexia associada ao câncer (Caillet *et al.*, 2017). Em um estudo prospectivo realizado por Rocha, *et al.* (2019), pacientes com CGI apresentaram maior prevalência de sintomas como diarreia, náusea e anorexia, corroborando com os achados do presente estudo.

Em um estudo com roedores, foram administrado dois conjuntos de quimioterápicos em dois grupos distintos: o primeiro grupo foi tratado com o protocolo FOLFOX (5-fluorouracil, leucovorin, oxaliplatina) e o segundo com o protocolo FOLFIRI (5-fluorouracil, leucovorin, CPT-11), quimioterápicos utilizados no tratamento de tumores do TGI. Os resultados demonstraram que os camundongos tratados com ambos os protocolos apresentaram perda de massa muscular e fraqueza muscular (Barreto *et al.*, 2016).

6.2. Associação dos Polimorfismos de Nucleotídeos Únicos com a perda de peso

O processo catabólico nos pacientes oncológicos aumenta o gasto energético em repouso, gerando atrofia e perda de massa muscular (Roy e Kumar, 2019). As vias catabólicas pelos quais fatores de transcrição como FOXO3, SMAD2 e SMAD3 e ativação de receptores como ACVR2B levam à atrofia muscular já está bem elucidada. Todavia, não se sabe se SNPs nos genes dessas proteínas e receptores contribuem para a perda de peso em pacientes oncológicos (Johns *et al.*, 2017)

Por meio da técnica de PCR quantitativo foi analisado os SNPs nos genes FOXO3 (rs1935949 e rs4946935), SELP (rs6136) e ACVR2B (rs2268757), e observou-se que apenas o SNP no gene ACVR2B foi associado à perda de peso em pacientes com CGI quando comparado ao Grupo Sem perda e Perda. Demonstrando que os SNPs nos genes FOXO3 e SELP não estão associados ao fenótipo de perda de peso.

Um estudo prévio em pacientes europeus caquéticos analisou SNPs candidatos para a perda de peso e massa muscular e demonstrou que SNPs avaliados no presente estudo estão associados à perda de peso (Johns *et al.* 2017). Estudos clínicos anteriores demonstraram que as formas totais e fosforiladas de FOXO1 e FOXO3 estão diminuídas no músculo esquelético de indivíduos caquéticos, sugerindo translocação para o núcleo destes fatores de transcrição (Puig-

Vilanova *et al.*, 2015; Schmitt *et al.*, 2007). A deleção dos membros da família FOXO em camundongos preveniu a atrofia e o enfraquecimento muscular, devido à inibição dos sistemas autofágico e ubiquitina-proteassoma (Milan *et al.*, 2015). Em um estudo recente com um modelo de câncer de cólon C26, camundongos *knockout* para mTOR1 especificamente na musculatura esquelética não apresentaram aumento adicional na perda de massa muscular. No entanto, após a ativação de Akt-mTORC1 pela administração de tamoxifeno foi observada a reversão completa da perda de massa muscular e força nos animais caquéticos (Geremia *et al.*, 2021). Embora algumas evidências pré-clínicas apontem para expressão inalterada no músculo esquelético de MuRF1 e MAFbx, outros marcadores devem ser considerados para avaliar a atividade do sistema ubiquitina-proteassoma, como as ligases E3 (MUSA1/Fbxo30 e SMART/Fbxo21) (Martin, Gallot e Freyssenet, 2023).

Apesar do nosso estudo não ter demonstrado uma associação dos SNPs no gene FOXO3 com a perda de peso, um estudo feito anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa revelou que no rs1935949 do gene FOXO3 está associado ao fenótipo da perda de peso no câncer de mama, indicando uma possível associação desse SNP com o tipo de câncer (Segura *et al.*, em revisão). Portanto, estudos com uma maior população e em diferentes tipos de tumores são necessários para investigar a associação desse SNP com o fenótipo da perda de peso, principalmente com a população brasileira.

Também foi demonstrado que pacientes com CGI e perda de peso apresentam o SNP no gene ACVR2B. Esse achado sugere uma maior ativação do receptor ACVR2B pelas proteínas pertencentes à família TGF- β , resultando em maior fosforilação e ativação dos fatores de transcrição SMAD2 e SMAD3. No entanto, mais estudos são necessários para compreender o efeito funcional de um SNP individual. Em camundongos portadores de adenocarcinoma pancreáticos o bloqueio da ligação da ativina usando o receptor solúvel ACVR2B/Fc atenuou a perda de peso e perda do músculo esquelético por meio da redução da expressão de Murf-1 e Atrogin-1, inibindo a caquexia (Zhong *et al.*, 2019). O bloqueio dos ligantes de ACVR2B em modelos de caquexia do câncer C26 resultou na melhora da sobrevivência decorrente da manutenção da massa muscular, demonstrando o papel do receptor na caquexia (Nissinen *et al.*, 2018b). Além disso, Zhong et al. (2022) observaram que o sexo tem impacto significativo na perda de massa muscular na caquexia. No estudo, os autores mostraram que a caquexia foi mais prevalente em camundongos machos com adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC), e que a administração de ACVR2B/Fc atenuou a caquexia apenas em camundongos machos. Uma possível explicação para isso é que homens com PDAC apresentam redução na expressão da família de proteínas folistatina, que são inibidores endógenos da ativina. Essa redução causa o

aumento da atividade da ativina e da sua ligação ao receptor ACVR2B, resultando em maior perda de peso (Zhong *et al.*, 2022). Apesar disso, ainda não está claro se a caquexia associada ao câncer é sexualmente dimórfica.

Ainda que o presente estudo não tenha demonstrado uma associação do SNP no gene SELP com a perda de peso, pesquisas anteriores em pacientes caquéticos identificaram o SNP rs6136 como um fator de risco preditivo para o desenvolvimento de caquexia (Avan *et al.*, 2014; Tan *et al.*, 2012a). Além disso, o alelo C desse polimorfismo foi associado a um risco reduzido de desenvolvimento de caquexia associada ao câncer (Tan *et al.*, 2012a). A discrepância observada na literatura em relação aos resultados apresentados pode ser atribuída ao fato de que a maioria dos estudos foi realizado em populações europeias, às quais apresentam diferentes perfis genéticos por conta de fatores migratórios, deriva genética e mutações (Shastry, 2009). Também é importante destacar que a análise dos SNPs não abrangeu todo o genoma humano, excluindo outras variantes que poderiam ter relevância funcional.

Em conjunto, esses dados indicam que, entre os SNPs selecionados nos genes FOXO3 (rs1935949 e rs4946935), SELP (rs6136) e ACVR2B (rs2268757), apenas o SNP no gene ACVR2B foi associado à perda de peso em pacientes com CGI.

6.3. Níveis elevados de ApN e GDF-15 na perda de peso em pacientes com CGI

As citocinas liberadas pelo tumor e pelos tecidos desempenham um papel crucial no desenvolvimento da perda de peso e da caquexia associada ao câncer, devido ao seu envolvimento nas alterações metabólicas e na anorexia (Argilés *et al.*, 2009). Utilizando o método de ensaio de imunoabsorção enzimática, foi demonstrado que os pacientes do Grupo Perda apresentaram níveis mais elevados de ApN em comparação com o Grupo Controle e Sem Perda. Em relação ao dimorfismo sexual, embora tenha sido demonstrado que tanto homens quanto mulheres do Grupo Perda apresentaram níveis elevados de ApN, é importante destacar que não houve diferença significativa entre eles. Esse resultado demonstra que os níveis elevados de ApN na perda de peso são independentes do sexo.

Um estudo realizado com pacientes diagnosticados com CGI também relatou altos níveis de ApN em pacientes caquéticos quando comparados com não caquéticos (Batista *et al.*, 2013). Da mesma forma, um estudo caso-controle encontrou níveis elevados em indivíduos com caquexia cardíaca cujo IMC era compatível com os não caquéticos. Com esses dados, os autores sugeriram que os níveis de ApN não são apenas uma resposta a variação do IMC, mas sim ao processo de perda de peso (Paulo Araújo *et al.*, 2009). Esses resultados contradizem trabalhos anteriores que não observaram uma relação causal entre os níveis de ApN e a perda

de peso (Bye *et al.*, 2016; Diakowska *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2012; Paval *et al.*, 2022; Wolf *et al.*, 2006). Adicionalmente, no presente estudo foi encontrada uma correlação fraca entre os níveis plasmáticos de ApN e a porcentagem de perda de peso após o início do tratamento quimioterápico. Infelizmente, os trabalhos disponíveis sobre a ApN apresentam discrepâncias devido à variação das metodologias utilizadas na avaliação da perda de peso. A falta de uniformidade nos desenhos experimentais pode influenciar seus níveis, uma vez que a ApN apresenta relação inversa com a adiposidade (Paval *et al.*, 2022). Além disso, os níveis de ApN também parecem ser afetados pelo tipo de tumor e o estadiamento tumoral (Nakajima *et al.*, 2010; Ntikoudi *et al.*, 2014).

Também foi observado no presente estudo que pacientes com perda de peso apresentaram níveis plasmáticos elevados de GDF-15 em comparação ao demais grupos estudados. Da mesma forma que a ApN, os níveis de GDF-15 foram elevados no Grupo Perda, tanto em mulheres quanto em homens, sem diferença significativa entre eles, indicando que os níveis dessa citocina também são independentes do sexo. Assim como esses achados, a literatura também demonstra que pacientes com câncer de pulmão, gastrointestinal e hepático apresentam níveis significativamente elevados de GDF-15 (Molfino *et al.*, 2020; Suzuki *et al.*, 2021). Esses níveis elevados foram associados a sintomas de anorexia, aumento de inflamação e baixo *score* de desempenho, características comuns observadas na caquexia (Suzuki *et al.*, 2021). Outros estudos mostraram que pacientes oncológicos com maiores concentrações plasmáticas GDF-15 foram associados a uma sobrevida global reduzida e aumento da perda de peso (Lerner *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2015).

Em camundongos caquéticos portadores de tumor de ovário (TOV21G), a neutralização de GDF-15 por meio da utilização de um anticorpo anti-GDF-15 foi capaz de reverter a perda de peso, melhorar a função muscular e o desempenho físico (Kim-Muller *et al.*, 2023). Atualmente, o Pongegromab, um inibidor seletivo do GDF-15, é considerado um alvo promissor para o tratamento da caquexia. Um ensaio clínico de fase IB em pacientes caquéticos em tratamento quimioterápico diagnosticados para câncer de pâncreas, colorretal metastático e câncer de pulmão de células não pequenas, administrou Pongegromab por via subcutânea durante 12 semanas, resultando em ganho de peso de 6,6% em relação ao valor basal, melhora no apetite e na capacidade física (Crawford *et al.*, 2024). No entanto, a ausência de controle com placebo e cegamento neste estudo representa uma limitação significativa que deve ser considerada.

Assim, esses achados sugerem que tanto ApN, como GDF-15 estão elevados em pacientes com CGI e perda de peso, independente do sexo. Permanece ainda a questão se apenas

a diminuição do tecido adiposo é responsável pelo aumento dos níveis de ApN ou se existe outro mecanismo molecular subjacente desencadeando essa perda.

7. CONCLUSÕES

É de extrema importância a busca por marcadores genéticos e bioquímicos que detectem precocemente a perda de peso em pacientes oncológicos, tornando menos suscetível a toxicidade ao tratamento, menor mortalidade e risco de complicações cirúrgicas e maior qualidade de vida. Com base nos resultados obtidos, chegou-se às seguintes conclusões:

1. Pacientes oncológicos com perda de peso apresentaram maior frequência de sinais e sintomas durante a quimioterapia, podendo contribuir para o agravamento da perda de peso;
2. Os níveis de ApN estão elevados em pacientes oncológicos com perda de peso independente do sexo, em comparação com o Grupo Controle e o Grupo Sem Perda. No entanto, não foi encontrada correlação entre os níveis de ApN e a perda de peso nos seis meses após o início da quimioterapia;
3. Pacientes oncológicos com perda de peso apresentam níveis plasmáticos elevados de GDF-15, independente do sexo, em comparação aos demais grupos estudados;
4. Entre os quatros SNPs estudados (FOXO3 rs1935949 e rs4946935, ACVR2B rs2268757 e SELP rs6136), apenas o ACVR2B rs2268757 mostrou associação com o fenótipo da perda de peso durante a quimioterapia em pacientes com CGI.

REFERÊNCIAS

- ABCP. Consenso Brasileiro de Caquexia/Anorexia em cuidados paliativos. **Revista Brasileira de Cuidados Paliativos**, São Paulo, v. 3, n. 3, p. 1-42, 2011.
- AHMED, D. S. *et al.* GDF15/GFRAL Pathway as a Metabolic Signature for Cachexia in Patients with Cancer. **Journal of Cancer**, v. 12, n. 4, p. 1125, 1 jan. 2021.
- ARENDS, J. *et al.* Cancer cachexia in adult patients: ESMO Clinical Practice Guidelines. **ESMO Open**, v. 6, n. 3, 1 jun. 2021.
- ARGILÉS, J. M. *et al.* Cancer cachexia: understanding the molecular basis. 2014.
- ARGILÉS, J. M. *et al.* The role of cytokines in cancer cachexia. **Current Opinion in Supportive and Palliative Care**, v. 3, n. 4, p. 263–268, dez. 2009.
- ARGILÉS, J. M. *et al.* Validation of the CACHexia SCORe (CASCO). Staging Cancer Patients: The Use of miniCASCO as a Simplified Tool. **Frontiers in physiology**, v. 8, 17 fev. 2017.
- ARGILÉS, J. M.; LÓPEZ-SORIANO, F. J.; BUSQUETS, S. Mediators of cachexia in cancer patients. **Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)**, v. 66, p. 11–15, 1 out. 2019.
- AVAN, ABOLFAZL *et al.* AKT1 and SELP Polymorphisms Predict the Risk of Developing Cachexia in Pancreatic Cancer Patients. **PLoS ONE**, v. 9, n. 9, p. 108057, 19 set. 2014.
- BARACOS, V. E. *et al.* **Cancer-associated cachexia. Nature Reviews Disease Primers.** Nature Publishing Group, 18 jan. 2018.
- BARBOSA, F. R. *et al.* Influence of catechol-O-methyltransferase (COMT) Gene Polymorphisms in Pain Sensibility of Brazilian Fibromyalgia Patients. **Rheumatol Int.**, v. 32, n. 2, p.427-30, 2012.
- BARRETO, R. *et al.* Chemotherapy-related cachexia is associated with mitochondrial depletion and the activation of ERK1/2 and p38 MAPKs. **Oncotarget**, v. 7, n. 28, p. 43442–43460, 2016.
- BATISTA, M. L. *et al.* Adipose tissue-derived factors as potential biomarkers in cachectic cancer patients. **Cytokine**, v. 61, n. 2, p. 532–539, 1 fev. 2013.
- BENNY KLIMEK, M. E. *et al.* Acute inhibition of myostatin-family proteins preserves skeletal muscle in mouse models of cancer cachexia. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 391, n. 3, p. 1548–1554, 15 jan. 2010.
- BRADLEY *et al.* Mecanismos Genéticos Básicos. In: ALBERTS *et al.* (org). **Biologia molecular da célula**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. cap. 4, p. 173- 236.
- BREEN, D. M. *et al.* GDF-15 Neutralization Alleviates Platinum-Based Chemotherapy-Induced Emesis, Anorexia, and Weight Loss in Mice and Nonhuman Primates. **Cell Metabolism**, v. 32, n. 6, p. 938- 950.e6, 1 dez. 2020.

BREIT, S. N.; BROWN, D. A.; TSAI, V. W. W. The GDF15-GFRAL Pathway in Health and Metabolic Disease: Friend or Foe? **Annual Review of Physiology**, v. 83, n. Volume 83, 2021, p. 127–151, 10 fev. 2021.

BYE, A. *et al.* Alterations in inflammatory biomarkers and energy intake in cancer cachexia: a prospective study in patients with inoperable pancreatic cancer. **Medical Oncology**, v. 33, n. 6, p. 1–9, 1 jun. 2016.

CAESTECKER, M. DE. The transforming growth factor-superfamily of receptors. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 15, p. 1–11, 2004.

CAILLET, P. *et al.* Association between cachexia, chemotherapy and outcomes in older cancer patients: A systematic review. **Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)**, v. 36, n. 6, p. 1473–1482, 1 dez. 2017.

CALLAWAY, C. S. *et al.* IL-8 Released from Human Pancreatic Cancer and Tumor-Associated Stromal Cells Signals through a CXCR2-ERK1/2 Axis to Induce Muscle Atrophy. **Cancers 2019, Vol. 11, Page 1863**, v. 11, n. 12, p. 1863, 25 nov. 2019.

CAO, Z. *et al.* Biomarkers for Cancer Cachexia: A Mini Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 9, 1 maio 2021.

CEDDIA, R. B. *et al.* Globular adiponectin increases GLUT4 translocation and glucose uptake but reduces glycogen synthesis in rat skeletal muscle cells. **Diabetologia**, v. 48, n. 1, p. 132–139, jan. 2005.

CNOP, M. *et al.* Relationship of adiponectin to body fat distribution, insulin sensitivity and plasma lipoproteins: evidence for independent roles of age and sex. **Diabetologia**, v. 46, n. 4, p. 459–469, 1 abr. 2003.

CRAWFORD, J. *et al.* A Phase Ib First-In-Patient Study Assessing the Safety, Tolerability, Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics of Ponegromabin Participants with Cancer and Cachexia. **Clinical Cancer Research**, v. 30, n. 3, p. 489–497, 1 fev. 2024.

DA ROCHA, I. M. G. *et al.* Is cachexia associated with chemotherapy toxicities in gastrointestinal cancer patients? A prospective study. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 10, n. 2, p. 445, 1 abr. 2019.

DAOU, H. N. Exercise as an Anti-inflammatory Therapy for Cancer Cachexia: A Focus on Interleukin-6 Regulation. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 318, n. 2, p.296-310, 2019.

DEWYS, W. D. *et al.* Prognostic effect of weight loss prior to chemotherapy in cancer patients. Eastern Cooperative Oncology Group. **The American journal of medicine**, v. 69, n. 4, p. 491–497, 1980.

DHANAPAL, R.; SARASWATHI, T. R.; GOVIND RAJKUMAR, N. Cancer cachexia. **Journal of oral and maxillofacial pathology: JOMFP**, v. 15, n. 3, p. 257–260, set. 2011.

DIAKOWSKA, D. *et al.* Serum Levels of Resistin, Adiponectin, and Apelin in Gastroesophageal Cancer Patients. **Disease Markers**, v. 2014, 2014.

FARADAY, N. *et al.* Leukocytes Can Enhance Platelet-mediated Aggregation and Thromboxane Release via Interaction of P-selectin Glycoprotein Ligand 1 with P-selectin. **Anesthesiology**, v. 94, n. 1, p. 145–151, 1 jan. 2001.

FEARON, K. C. H.; GLASS, D. J.; GUTTRIDGE, D. C. Cancer cachexia: mediators, signaling, and metabolic pathways. **Cell metabolism**, v. 16, n. 2, p. 153–166, 8 ago. 2012.

FEARON, K. *et al.* Definition and classification of cancer cachexia: an international consensus. **The Lancet. Oncology**, v. 12, n. 5, p. 489–495, maio 2011.

FEARON, K; ARENDS, J.; BARACOS, V. Understanding the mechanisms and treatment options in câncer cachexia. **Nat Rev Clin Oncol.**, v. 10, p. 90-99, dez.2012.

FRANCESCHINI, J. *et al.* Reprodutibilidade da versão em português do Brasil do European Organization for Research and Treatment of Cancer Core Quality of Life Questionnaire em conjunto com seu módulo específico para câncer de pulmão. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 36, n. 5, p. 595–602, 2010.

FRANKENBERG, A. D. VON; REIS, A. F.; GERCHMAN, F. Relationships between adiponectin levels, the metabolic syndrome, and type 2 diabetes: a literature review. **Archives of Endocrinology and Metabolism**, v. 61, n. 6, p. 614–622, 1 dez. 2017.

GEPPERT, J.; ROHM, M. Cancer cachexia: biomarkers and the influence of age. **Molecular oncology**, 2024.

GEREMIA, A. *et al.* Activation of Akt-mTORC1 signalling reverts cancer-dependent muscle wasting. 2021.

GILMORE, L. A. *et al.* A preponderance of gastrointestinal cancer patients transitions into cachexia syndrome. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 13, n. 6, p. 2920, 1 dez. 2022.

GONZALEZ, M. C; BORGES, L.R; SILVEIRA, D. H; ASSUNÇÃO, M. C. F ORLANDI, S. P. Validação da versão em português da avaliação subjetiva global produzida pelo paciente. **Rev Bras Nutr Clin**, v. 25, n. 2, p. 102-108, 2010.

HAN, J. *et al.* Imaging modalities for diagnosis and monitoring of cancer cachexia. **EJNMMI Research 2021 11:1**, v. 11, n. 1, p. 1–18, 23 set. 2021.

HELLEN, N. *et al.* P-selectin mobility undergoes a sol-gel transition as it diffuses from exocytosis sites into the cell membrane. **Nature Communications 2022 13:1**, v. 13, n. 1, p. 1–11, 31 maio 2022.

HOTTA, K. *et al.* Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 20, n. 6, p. 1595–1599, 2000.

HSU, J. Y. *et al.* Non-homeostatic body weight regulation through a brainstem-restricted receptor for GDF15. **Nature**, v. 550, n. 7675, p. 255–259, 12 out. 2017.

HULMI, J. J. *et al.* Targeting the Activin Receptor Signaling to Counteract the Multi-Systemic Complications of Cancer and Its Treatments. **Cells** **2021**, Vol. **10**, Page **516**, v. 10, n. 3, p. 516, 28 fev. 2021.

INCA - Instituto Nacional Do Câncer. **Estatísticas de câncer**. 2022a. Disponível em: Acesso em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/numeros>.

INCA - Instituto Nacional Do Câncer. **INCA estima 704 mil casos de câncer por ano no Brasil até 2025**. 2022b. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/noticias/2022/inca-estima-704-mil-casos-de-cancer-por-ano-no-brasil-ate-2025>.

INCA - Instituto Nacional Do Câncer. **Tendência de aumento do número de casos de câncer de intestino exige estratégias de prevenção**. 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/noticias/2021/tendencia-de-aumento-do-numero-de-casos-de-cancer-de-intestino-exige-estrategias-de-prevencao>.

ISLAMI, F. *et al.* Proportion and number of cancer cases and deaths attributable to potentially modifiable risk factors in the United States. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 1, p. 31–54, 1 jan. 2018.

JOHNS N, STRETCH C, TAN BH, *et al.* New genetic signatures associated with cancer cachexia as defined by low skeletal muscle index and weight loss. **J Cachexia Sarcopenia Muscle**, v. 8, n. 1, p. 122-130, 2017.

KADAKIA, K. C.; HAMILTON-REEVES, J. M.; BARACOS, V. E. Current Therapeutic Targets in Cancer Cachexia: A Pathophysiologic Approach. **American Society of Clinical Oncology educational book. American Society of Clinical Oncology. Annual Meeting**, v. 43, n. 43, jun. 2023.

KARUPPANNAN, M.; MUTHANNA, F. M. S.; MOHD FAUZI, F. Breaking Down Cachexia: A Narrative Review on the Prevalence of Cachexia in Cancer Patients and Its Associated Risk Factors. **Nutrition and cancer**, v. 76, n. 5, p. 404–418, 2024.

KIM, HYUN JUNG *et al.* Pathophysiological Role of Hormones and Cytokines in Cancer Cachexia. **Journal of Korean Medical Science**, v. 27, n. 2, p. 128, 2012.

KIM-MULLER, J. Y. *et al.* GDF15 neutralization restores muscle function and physical performance in a mouse model of cancer cachexia. **Cell Reports**, v. 42, n. 1, p. 111947, 31 jan. 2023.

LERNER, L. *et al.* Growth differentiating factor-15 (GDF-15): A potential biomarker and therapeutic target for cancer-associated weight loss. **Oncology Letters**, v. 12, n. 5, p. 4219, 1 nov. 2016.

LEY, K. *et al.* Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. **Nature Reviews Immunology** **2007 7:9**, v. 7, n. 9, p. 678–689, set. 2007.

LEY, K. The role of selectins in inflammation and disease. **Trends in Molecular Medicine**, v. 9, n. 6, p. 263–268, 1 jun. 2003.

LI, C. *et al.* GDF15 promotes EMT and metastasis in colorectal cancer. **Oncotarget**, v. 7, n. 1, p. 860–872, 22 out. 2015.

MANNELLI, M. *et al.* The Adipokines in Cancer Cachexia. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 14, p. 1–21, 2 jul. 2020.

MARTIN, A.; FREYSSNET, D. Phenotypic features of cancer cachexia-related loss of skeletal muscle mass and function: lessons from human and animal studies. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 12, n. 2, p. 252–273, 1 abr. 2021.

MARTIN, A.; GALLOT, Y. S.; FREYSSNET, D. Molecular mechanisms of cancer cachexia-related loss of skeletal muscle mass: data analysis from preclinical and clinical studies. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 14, n. 3, p. 1150, 1 jun. 2023.

MATTU, H. S.; RANDEVA, H. S. Role of adipokines in cardiovascular disease. *J Endocrinol.*, v. 216, n. 1, p. 17-36, jan. 2013.

MCKINNELL, I. W.; RUDNICKI, M. A. Molecular mechanisms of muscle atrophy. **Cell**, v. 119, n. 7, p. 907–910, 29 dez. 2004.

MEZA-VALDERRAMA, D. *et al.* Sarcopenia, Malnutrition, and Cachexia: Adapting Definitions and Terminology of Nutritional Disorders in Older People with Cancer. **Nutrients**, v. 13, n. 3, p. 1–11, 1 mar. 2021.

MILAN, G. *et al.* Regulation of autophagy and the ubiquitin–proteasome system by the FoxO transcriptional network during muscle atrophy. **Nature Communications** 2015 6:1, v. 6, n. 1, p. 1–14, 10 abr. 2015.

MOLFINO, A. *et al.* Association between Growth Differentiation Factor-15 (GDF-15) Serum Levels, Anorexia and Low Muscle Mass among Cancer Patients. **Cancers** 2021, Vol. 13, Page 99, v. 13, n. 1, p. 99, 31 dez. 2020.

MORGAN, E. *et al.* The Global Landscape of Esophageal Squamous Cell Carcinoma and Esophageal Adenocarcinoma Incidence and Mortality in 2020 and Projections to 2040: New Estimates from GLOBOCAN 2020. **Gastroenterology**, v. 163, n. 3, p. 649- 658.e2, 1 set. 2022.

NAKAJIMA, T. E. *et al.* Adipocytokines as new promising markers of colorectal tumors: Adiponectin for colorectal adenoma, and resistin and visfatin for colorectal cancer. **Cancer Science**, v. 101, n. 5, p. 1286–1291, maio 2010.

NISHIZAWA, H. *et al.* Androgens decrease plasma adiponectin, an insulin-sensitizing adipocyte-derived protein. **Diabetes**, v. 51, n. 9, p. 2734–2741, 2002.

NISSINEN, T. A. *et al.* Systemic blockade of ACVR2B ligands prevents chemotherapy-induced muscle wasting by restoring muscle protein synthesis without affecting oxidative capacity or atrogenes. **Scientific reports**, v. 6, 26 set. 2016.

NISSINEN, T. A. *et al.* Treating cachexia using soluble ACVR2B improves survival, alters mTOR localization, and attenuates liver and spleen responses. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 9, n. 3, p. 514, 1 jun. 2018a.

NTIKOUDI, E. *et al.* Hormones of adipose tissue and their biologic role in lung cancer. **Cancer Treatment Reviews**, v. 40, n. 1, p. 22–30, 1 fev. 2014.

OCKENGA, J.; VALENTINI, L. Review article: anorexia and cachexia in gastrointestinal cancer. **Alimentary pharmacology & therapeutics**, v. 22, n. 7, p. 583–594, 1 out. 2005.

OLIVEIRA, A. G.; GOMES-MARCONDES, M. C. C. Metformin treatment modulates the tumour-induced wasting effects in muscle protein metabolism minimising the cachexia in tumour-bearing rats. **BMC Cancer**, v. 16, n. 1, 7 jul. 2016.

OPAS - Organização Pan-Americana da Saúde. **Câncer**, 2020. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/topicos/cancer>.

PARIDA, S.; SIDDHARTH, S.; SHARMA, D. Adiponectin, Obesity, and Cancer: Clash of the Bigwigs in Health and Disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 10, 2 maio 2019.

PAULO ARAÚJO, J. *et al.* Adiponectin is increased in cardiac cachexia irrespective of body mass index. **European Journal of Heart Failure**, v. 11, n. 6, p. 567–572, 1 jun. 2009.

PAVAL, D. R. *et al.* A systematic review examining the relationship between cytokines and cachexia in incurable cancer. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 13, n. 2, p. 824–838, 1 abr. 2022.

PIN, F. *et al.* Cachexia induced by câncer and chemotherapy yield distinct perturbations to energy metabolism. **J Cachexia Sarcopenia Muscle**, v. 10, n. 1, p. 140-154, fev. 2019.

PRADO, C. M. *et al.* Prevalence and clinical implications of sarcopenic obesity in patients with solid tumours of the respiratory and gastrointestinal tracts: a population-based study. **The Lancet Oncology**, v. 9, n. 7, p. 629–635, 1 jul. 2008.

PRADO, C. M. M.; HEYMSFIELD, S. B. Lean Tissue Imaging: A New Era for Nutritional Assessment and Intervention. **JPEN. Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 38, n. 8, p. 940, 11 nov. 2014.

PUIG-VILANOVA, E. *et al.* Oxidative stress, redox signaling pathways, and autophagy in cachectic muscles of male patients with advanced COPD and lung cancer. **Free radical biology & medicine**, v. 79, p. 91–108, 2015.

RAUSCH, V. *et al.* Understanding the common mechanisms of heart and skeletal muscle wasting in cancer cachexia. **Oncogenesis**, v. 10, n. 1, p. 1, 1 jan. 2021.

ROCHA, I. M. G. DA *et al.* Is cachexia associated with chemotherapy toxicities in gastrointestinal cancer patients? A prospective study. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 10, n. 2, p. 445, 1 abr. 2019.

ROY, A.; KUMAR, A. ER Stress and Unfolded Protein Response in Cancer Cachexia. **Cancers**, v. 11, n. 12, 1 dez. 2019.

SADEGHI, M. *et al.* Cancer cachexia: Diagnosis, assessment, and treatment. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 127, p. 91–104, 1 jul. 2018.

SCHCOLNIK-CABRERA, A. *et al.* Understanding tumor anabolism and patient catabolism in cancer-associated cachexia. **American Journal of Cancer Research**, v. 7, n. 5, p. 1107, 2017.

SCHMITT, T. L. *et al.* Activity of the Akt-dependent anabolic and catabolic pathways in muscle and liver samples in cancer-related cachexia. **Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)**, v. 85, n. 6, p. 647–654, 2007.

SETIAWAN, T. *et al.* Cancer cachexia: molecular mechanisms and treatment strategies. **Journal of Hematology & Oncology 2023 16:1**, v. 16, n. 1, p. 1–26, 22 maio 2023.

SHASTRY, B. S. SNPs: impact on gene function and phenotype. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 578, p. 3–22, 2009.

SIDDIQUI, J. A. *et al.* Pathophysiological role of growth differentiation factor 15 (GDF15) in obesity, cancer, and cachexia. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 64, p. 71–83, 1 abr. 2022.

STORGAARD, H. *et al.* Relationships of plasma adiponectin level and adiponectin receptors 1 and 2 gene expression to insulin sensitivity and glucose and fat metabolism in monozygotic and dizygotic twins. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 92, n. 7, p. 2835–2839, 2007.

SURIBEN, R. *et al.* Antibody-mediated inhibition of GDF15–GFRAL activity reverses cancer cachexia in mice. **Nature Medicine 2020 26:8**, v. 26, n. 8, p. 1264–1270, 13 jul. 2020.

SUZUKI, H. *et al.* Clinical and tumor characteristics of patients with high serum levels of growth differentiation factor 15 in advanced pancreatic cancer. **Cancers**, v. 13, n. 19, p. 4842, 1 out. 2021.

TAN, C. R. *et al.* Pancreatic cancer cachexia: a review of mechanisms and therapeutics. **Frontiers in physiology**, v. 5, 2014.

TAN, C. R. *et al.* P-selectin genotype is associated with the development of cancer cachexia. **EMBO Molecular Medicine**, v. 4, n. 6, p. 462–471, 4 jun. 2012b.

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.

VIEIRA, A. R.; FORTES, R. C. Qualidade de vida de pacientes com câncer gastrointestinal. **Com. Ciências Saúde**, v. 26, p. 45-56, jun. 2015.

WANG, Y. *et al.* Cancer cachexia: Focus on cachexia factors and inter-organ communication. **Chinese Medical Journal**, v. 137, n. 1, p. 44, 1 jan. 2024.

WANG, Y.; ZHOU, Y.; GRAVES, D. T. FOXO Transcription Factors: Their Clinical Significance and Regulation. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

WANG, Z. V.; SCHERER, P. E. Adiponectin, the past two decades. **Journal of Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 2, p. 93, 1 abr. 2016.

WEBER, B. Z. C.; ARABACI, D. H.; KIR, S. Metabolic Reprogramming in Adipose Tissue During Cancer Cachexia. **Frontiers in Oncology**, v. 12, 12 maio 2022.

WHEELWRIGHT, S. *et al.* A systematic review of health-related quality of life instruments in patients with cancer cachexia. **Supportive Care in Cancer**, v. 21, n. 9, p. 2625–2636, 25 set. 2013.

WINBANKS, C. E. *et al.* Smad7 gene delivery prevents muscle wasting associated with cancer cachexia in mice. **Science Translational Medicine**, v. 8, n. 348, 20 jul. 2016.

WOLF, I. *et al.* Adiponectin, ghrelin, and leptin in cancer cachexia in breast and colon cancer patients. **Cancer**, v. 106, n. 4, p. 966–973, 15 fev. 2006.

YAMAUCHI, T. *et al.* Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. **Nature**, v. 423, n. 6941, p. 762–769, 12 jun. 2003.

ZHONG, X. *et al.* Sex specificity of pancreatic cancer cachexia phenotypes, mechanisms, and treatment in mice and humans: role of Activin. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 13, n. 4, p. 2146–2161, 1 ago. 2022.

ZHONG, X. *et al.* The systemic activin response to pancreatic cancer: implications for effective cancer cachexia therapy. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 10, n. 5, p. 1083, 1 out. 2019.

APÊNDICES

APÊNDICE 1 - Questionário de avaliação global e alimentar do paciente oncológico.

Protocolo de Avaliação Nutricional do Paciente Oncológico

Data da avaliação: ____/____/____

Local: _____

1 DADOS DE IDENTIFICAÇÃO

Nome: _____

Nº Protocolo: _____ Naturalidade: _____

Data de nascimento: ____/____/____ Idade: _____ Gênero: ()F ()M

Raça/cor: () Branca () Preta () Parda () Amarela () Indígena

2 DADOS SOBRE O CÂNCER (CRF)

Data do diagnóstico histológico: ____/____/____

Localização:

Estágio: _____ Estadiamento tumoral: _____

Metástase: () sim () não local: _____

Tratamentos prévios para o câncer:

Cirurgia Data: ____/____/____ Tipo de cirurgia _____

Quimioterapias Prévias: () Paliativa () Adjuvante () Curativa

Droga	Data De Início	Data Do Término	Nº De Ciclos	Dose	Resposta

Radioterapias Prévias: () Está realizando () QT + radioterapia () Já realizou

Local Irradiado	Finalidade	Data De Início	Data Do Término	Total Cgy

Total de kg perdido: _____

% de perda de peso: _____

6 AVALIAÇÃO DA PERFORMANCE FÍSICA

- a. sem disfunção (capacidade completa)
- b. Paciente totalmente acamado
- c. Fadiga: sim não
- d. Esforço ao subir escadas: nenhum um pouco bastante muito
- e. Cansaço ao caminhar meio quilômetro: nenhum um pouco bastante muito

7 AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE VIDA – Perguntas sobre a semana passada

	Não	Pouco	Bastante	Muito
Precisa ficar na cama ou em uma cadeira durante o dia?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Estava limitado em fazer seu trabalho ou outras atividades diárias?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Estava limitado em perseguir seus hobbies ou outras atividades de lazer?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Teve dor?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Precisa descansar?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	Não	Pouco	Bastante	Muito
Tem se sentido fraco?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Dor interferiu nas suas atividades diárias?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Dificuldade em se concentrar como ler um jornal ou assistir televisão?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
A sua condição física ou tratamento médico interferiu na sua vida familiar?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	Excelente	Bom	Ruim	Muito Ruim
Como você avalia sua saúde geral durante a última semana?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Como você avalia a sua qualidade de vida geral durante a última semana?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

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

- Apetite: muito pouco pouco médio bom muito bom

- Saciedade: Me sinto cheio depois de comer apenas um pouco
 Me sinto cheio depois de comer cerca de 1/3 da refeição
 Me sinto cheio depois de comer mais de 1/2 refeição
 Me sinto cheio depois de comer a maior parte da refeição
 Eu quase nunca me sinto cheio.

APÊNDICE 2 - Termo de consentimento livre e esclarecido (TLCE - pacientes oncológicos)

1. NOME DA PESQUISA: “Determinação de fatores de risco associados a perda de peso em pacientes oncológicos”

2. PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Prof^ª. Dr^ª. Ana Lúcia Fachin

2.1 MÉDICO RESPONSÁVEL: Prof. Dr. Adilson Aparecido Faccio

2.2 MESTRANDA: Laura de Martin Coletti

3. PATROCINADOR QUE APOIA 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 RAZÕES DA PESQUISA, SEUS RISCOS E BENEFÍCIOS, E DECIDIR, LIVREMENTE, QUANTO A SUA ANUÊNCIA OU NÃO EM PARTICIPAR DO PROJETO.

Prezado Doador, meu nome é Laura de Martin Coletti, sou aluna de Mestrado em Biotecnologia Aplicada à saúde da Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP), orientada pela Prof.^a. Dr^ª. 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 Ribeirãoopretano de Combate ao Câncer, localizado no Hospital Beneficência Portuguesa de Ribeirão Preto/SP, no intuito de utilizar este sangue para estudar genes e substâncias biológicas relacionadas a pacientes oncológicos com perda de peso durante o tratamento quimioterápico. Para participar desta pesquisa precisarei do seu consentimento para aplicação de um questionário para avaliar a condição nutricional do paciente e 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 oncológicos e aplicar métodos e aparelhos modernos para analisar as variantes biológicas 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 “**DETERMINAÇÃO DE FATORES DE RISCO ASSOCIADO A PERDA DE PESO EM PACIENTES ONCOLÓGICOS**” 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

Assinatura da responsável da pesquisa

Profa. Dra. Ana Lúcia 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 Mestranda
Laura de Martin Coletti
Rua José Pierre, 95 apto 1009 – Ribeirão Preto/SP - CEP 14096-630
CPF: 48516468879 - RG: 52761083-5
Email: laura_coletti@hotmail.com

APÊNDICE 3 - Termo de consentimento livre e esclarecido (CONTROLE-LAC)

1. NOME DA PESQUISA: **“Determinação de fatores de risco associados a perda de peso em pacientes oncológicos”**

2. PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Prof^ª. Dr^ª. Ana Lúcia Fachin

2. 1 MÉDICO RESPONSÁVEL: Prof. Dr. Adilson Aparecido Faccio

2. 2 MESTRANDA: Laura de Martin Coletti

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 Laura de Martin Coletti, sou aluna de Mestrado em Biotecnologia Aplicada á saúde da Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP), orientada pela Prof^ª. Dr^ª. 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 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 utilizá-lo como controle no nosso projeto que estuda polimorfismos e citocinas ligados a pacientes oncológicos com perda de peso durante o tratamento quimioterápico.

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 as variantes biológicas 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 “**DETERMINAÇÃO DE FATORES DE RISCO ASSOCIADO A PERDA DE PESO EM PACIENTES ONCOLÓGICOS**” 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

Assinatura da responsável da pesquisa

Profa. Dra. Ana Lúcia 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 Mestranda

Laura de Martin Coletti


Rua José Pierre, 95 apto 1009 – Ribeirão Preto/SP - CEP 14096-630

CPF: 48516468879 - RG: 52761083-5

Email: laura_coletti@hotmail.com

ANEXOS

ANEXO 1 – Autorização do Prof. Dr. Adilson Aparecido Faccio para coleta de dados e de material biológico dos pacientes no Instituto Ribeirãopretano de Combate ao Câncer.

 **UNAERP**
Universidade de Ribeirão Preto

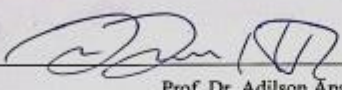
Ribeirão Preto SP
Av. Costabile Romano, 2201
(16) 3603-7000
CEP 14096-900

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

Ribeirão Preto, 28 de setembro de 2022

AUTORIZAÇÃO

Venho por meio desta 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 câncer que apresentam caquexia, do projeto intitulado: "Determinação de fatores de risco associados a perda de peso em pacientes oncológicos" sob responsabilidade da Prof.^a Ana Lúcia Fachin Saltoratto.



Prof. Dr. Adilson Aparecido Faccio

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

ANEXO 2 – Autorização da Carla Denipotte Gallon Pitta no laboratório de análises clínicas (LAC) do Curso de Ciências Farmacêuticas da Universidade de Ribeirão Preto.



Ribeirão Preto - SP
Av. Costabile Romano, 2201
(18) 3603-7000
CEP 14096-900
Guarujá SP
Av. D. Pedro I, 3300
(13) 3388-1000
CEP 11440-003
www.unaerp.br

Ribeirão Preto, 28 de setembro de 2022

AUTORIZAÇÃO

Venho por meio desta autorizar a coleta de 5 ml de sangue de 50 indivíduos saudáveis atendidos no LAC durante o prazo de um ano. O sangue coletado será utilizado no projeto intitulado: "Determinação de fatores de risco associados a perda de peso em pacientes oncológicos" sob responsabilidade da Prof.^a Ana Lúcia Fachin Saltoratto que está sendo realizado na Unidade de Biotecnologia UNAERP, sendo que todo material para a coleta será fornecido pelo pesquisador.

Carla Denipotte Gallon Pitta

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

ANEXO 3 – Autorização do coordenador da Unidade de Biotecnologia Prof. Dr. Mozart Marins.



Ribeirão Preto SP
Av. Costabile Romano, 2201
(16) 3603-7000
CEP 14096-900
Guarujá SP
Av. D. Pedro I, 3300
(13) 3398-1000
CEP 11440-003
www.unaerp.br

Ribeirão Preto, 28 de setembro de 2022

AUTORIZAÇÃO

Venho por meio desta autorizar o uso do laboratório de Biociências da Unidade de Biotecnologia para o processamento das amostras de sangue de pacientes oncológicos e amostras controle do projeto intitulado "Determinação de fatores de risco associados a perda de peso em pacientes oncológicos" sob responsabilidade da Prof.^a Ana Lúcia Fachin Saltoratto.

Prof. Dr. Mozart Marins

Coordenador da Unidade de Biotecnologia
Prof. Dr. Mozart Marins
Coordenador do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia
UNAERP
Unidade da Universidade de Ribeirão Preto

ANEXO 4 – Região no genoma humano em que foram identificados a presença dos SNPs nos genes FOXO3 (rs1935949), FOXO3 (rs4946935), ACVRB2V (rs2268757) e SELP (rs6136), respectivamente.

