



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E CULTURA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
NÚCLEO DE PESQUISA EM PLANTAS MEDICINAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM FARMACOLOGIA**

MICKAEL LAUDRUP DE SOUSA CAVALCANTE

**ENVOLVIMENTO VAGAL E DE RECEPTORES β -ADRENÉRGICOS E
CANABINOIDES NA ACELERAÇÃO DO ESVAZIAMENTO GÁSTRICO
INDUZIDA POR CÉLULAS DE YOSHIDA AH-130 EM RATOS**

TERESINA – PI

2019

MICKAEL LAUDRUP DE SOUSA CAVALCANTE

**ENVOLVIMENTO VAGAL E DE RECEPTORES β -ADRENÉRGICOS E
CANABINOIDES NA ACELERAÇÃO DO ESVAZIAMENTO GÁSTRICO
INDUZIDA POR CÉLULAS DE YOSHIDA AH-130 EM RATOS**

Dissertação apresentada à coordenação do Programa de Pós-graduação em Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal do Piauí, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Moisés Tolentino Bento da Silva.

TERESINA – PI

2019

FICHA CATALOGRÁFICA

Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial do CCS
Serviço de Processamento Técnico

C376e Cavalcante, Mickael Laudrup de Sousa.
Envolvimento vagal e de receptores β -adrenérgicos e canabinoides na
aceleração do esvaziamento gástrico induzida por células de Yoshida AH-130
em ratos / Mickael Laudrup de Sousa Cavalcante. -- Teresina, 2019.
166 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Programa de
Pós-Graduação em Farmacologia, 2019.

“Orientação: Prof. Dr. Moisés Tolentino Bento da Silva.”
Bibliografia

1. Caquexia associada ao câncer. 2. Motilidade gastrintestinal. 3. β 1-
adrenérgico. 4. Nervo vago. 5. Sistema endocanabinoide. I. Título.

CDD 615.5

Elaborada por Fabíola Nunes Brasilino CRB 3/ 1014

MICKAEL LAUDRUP DE SOUSA CAVALCANTE

**ENVOLVIMENTO VAGAL E DE RECEPTORES β -ADRENÉRGICOS E
CANABINOIDES NA ACELERAÇÃO DO ESVAZIAMENTO GÁSTRICO
INDUZIDA POR CÉLULAS DE YOSHIDA AH-130 EM RATOS**

DATA DE APROVAÇÃO DA DISSERTAÇÃO: 08 / MAIO / 2019

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. MOISÉS TOLENTINO BENTO DA SILVA

Presidente

Universidade Federal do Piauí – UFPI



Prof. Dr. PEDRO JORGE CALDAS MAGALHÃES

Examinador externo

Universidade Federal do Ceará – UFC



Prof. Dr. EMÍDIO MARQUES DE MATOS NETO

Examinador interno

Universidade Federal do Piauí – UFPI



Aos pacientes acometidos por desordens relacionadas ao câncer, os quais têm encorajado e inspirado o desenvolvimento de pesquisas científicas, guiadas pelo anseio de uma vida biologicamente plena.

E aos meus ratinhos albinos que, indubitavelmente, são os protagonistas maiores deste estudo, assim como de tantos outros, e merecem, portanto, todo o mérito.

Agradecimientos

A **Deus**, por ser minha inesgotável e suficiente fonte de Fé, e que por sua infinita bondade, permitiu a concretização desta importante etapa.

À **Universidade Federal do Piauí (UFPI)**, pelas experiências acadêmicas enriquecedoras e inesquecíveis, referentes aos componentes curriculares da pós-graduação e atividades correlatas desenvolvidos nas dependências físicas dos Centros de Ciências da Saúde, da Natureza, da Educação, Humanas e Linguagens, Tecnologia, e Agrárias.

À **CAPES** (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior) e ao **CNPq** (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela indispensável concessão de financiamento para este referido trabalho de pesquisa científica.

Ao **Núcleo de Pesquisas em Plantas Mediciniais (NPPM)**, pelas atividades colaborativas desenvolvidas nos laboratórios de pesquisa, bem como pelas palestras multidisciplinares, realizadas nas instalações e destinadas aos discentes da pós-graduação. Aos funcionários, **Patrícia Portela** e **Josi Albuquerque**, pelas palavras de incentivo.

A todo o **Corpo Docente do Programa de Pós-graduação em Farmacologia**, composto pelos professores efetivos e colaboradores, os quais foram fundamentais para o conhecimento construído e adquirido ao longo das aulas e seminários. Em especial à professora e coordenadora do Mestrado **Dra. Fernanda Regina de Castro Almeida**, pelo acompanhamento e ensinamentos durante a disciplina de Práticas de Ensino e Estágio em Docência, nos cursos de Medicina e Nutrição, respectivamente.

Ao professor orientador do presente estudo, **Dr. Moisés Tolentino Bento da Silva**, pela atenção destinada à rigorosa execução do mesmo, elucidação de questionamentos, bem como pelo aprendizado teórico e prático alcançado durante a execução dos protocolos experimentais.

Ao professor **Dr. Emídio Marques de Matos Neto**, pela gentil concessão das células tumorais de Yoshida AH-130, e pelos imprescindíveis esclarecimentos de eventuais dúvidas pertinentes ao modelo experimental de caquexia associada ao câncer.

Aos todos os amigos da **Turma do Mestrado** em Farmacologia. Pelas alegrias vividas durante todo o período da pós-graduação, e palavras de incentivo durante os momentos difíceis. Com atenção especial para **Monique Luana**, **Lorranya Éveli**, e **Daniel Nunes**, que ajudaram-me imensamente na aprendizagem acerca do manuseio do sistema de banho de órgãos; **Jéssica Vanessa**, **Mariana Sousa**, **Thamires Mendonça**, e **Raísa Santos**, por compartilhar conversas descontraídas, e as prazerosas agonias de trabalhar com sistema endócrino e metabolismo.

Aos colegas do **Laboratório de Exercício e Trato Gastrointestinal** que puderam contribuir direta ou indiretamente, nas etapas deste trabalho. Com um enfoque especial aos alunos de Iniciação Científica que não hesitaram em demonstrar engajamento e comprometimento com o propósito da presente pesquisa.

Aos pesquisadores do **Laboratório da Inflamação e Desordens Gastrointestinais (LAFDIG)**, no *campus* de Parnaíba, da Universidade Federal do Piauí, e do **Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer (LAFICA)**, no *campus* de Fortaleza, da Universidade Federal do Ceará os quais contribuíram, respectivamente, para a realização dos protocolos de estresse oxidativo e citocinas. Em especial à **Ana Karolina (Karol)** e **Juliana Severo**, por suas disponibilidades e alegrias contagiantes.

Aos meus pais **José Brivaldo da Silva Cavalcante** e **Alexsandra Pereira de Sousa Cavalcante**, pelo dom da vida, e pelo imenso e incondicional apoio em minhas escolhas, e a toda a minha família.

A todos os meus **Professores do curso de graduação em Biomedicina, do Centro Universitário UNINOVAFAPI**, coordenados pelo professor **Dr. Antônio Luiz Gomes Júnior**, cuja dedicação e respeito pelo exercício da profissão transbordam aos olhos. Com um carinho especial à professora **Dra. Tatiana Vieira Souza Chaves**, e ao professor **Dr. Fabrício Ibiapina Tapety**, os quais acreditaram no meu potencial e recomendaram-me, cheios de empolgação, para a seleção do Mestrado, através de carta impressa.

A todos, o meu Muito Obrigado !

Mickael Laudrup.

*“I live for the applause, applause, applause
I live for the applause-please, live for the applause-please
Live for the way that you cheer and scream for me
The applause, applause, applause.”*

S. J. A. Germanotta

CAVALCANTE, M. L. de S. Envolvimento vagal e de receptores β -adrenérgicos e canabinoides na aceleração do esvaziamento gástrico induzida por células de Yoshida AH-130 em ratos [dissertação]. Piauí: Programa de Pós-graduação em Farmacologia, Universidade Federal do Piauí; 2019.

RESUMO

INTRODUÇÃO: A caquexia associada ao câncer é caracterizada por uma redução significativa do peso corporal em decorrência da atrofia do músculo esquelético, a qual apresenta alterações nos sistemas cardiovascular e gastrointestinal, como ativação do sistema nervoso simpático, constipação decorrente de obstrução gastrointestinal, e elevação paradoxal nas concentrações de grelina. **OBJETIVO:** Investigar o envolvimento vagal e de receptores β -adrenérgicos e canabinoides nas alterações gastrointestinais de ratos com caquexia induzida por células de Yoshida AH-130. **MATERIAL E MÉTODOS:** O modelo experimental de caquexia (CQX) foi induzido por meio da inoculação intraperitoneal de células (10^8) de Yoshida AH-130, em ratos Wistar. Foram analisadas alterações fisiológicas gerais e gástricas. Para a elucidação dos mecanismos envolvidos, investigou-se a participação da sinalização adrenérgica em receptores β_1 , no qual os animais com caquexia foram submetidos à administração diária de atenolol (ATN) (20 mg/kg, v.o.). Em seguida, investigou-se o envolvimento das vias neurais parassimpáticas, no qual os animais com caquexia foram previamente submetidos à vagotomia troncular subdiafragmática (VGX). Por fim, investigou-se o papel das vias endocanabinoides, no qual os animais com caquexia foram submetidos à administração diária de win 55,212-2 (WIN) (2 mg/kg, s.c.). **RESULTADOS:** Em comparação ao grupo Controle, o grupo CQX apresentou, de forma significativa ($p < 0,05$), uma diminuição no ganho do peso corporal ($11,2 \pm 1,3$ g vs. $-27,3 \pm 3,5$ g), aumento no índice de caquexia ($0,1 \pm 0,5\%$ vs. $38,5 \pm 2,1\%$), e redução no consumo alimentar no 5º dia ($25,1 \pm 0,7$ g vs. $15,0 \pm 0,7$ g), 6º dia ($25,0 \pm 2,1$ g vs. $15,9 \pm 1,2$ g), e 7º dia ($27,7 \pm 1,2$ g vs. $12,9 \pm 0,9$ g), juntamente com um aumento no esvaziamento gástrico (AUC $12349,8 \pm 890,5$ $\mu\text{g} \times \text{min/mL}$ vs. $20.360,17 \pm 1.970,9$ $\mu\text{g} \times \text{min/mL}$), aumento na porcentagem de contração de tiras de fundo gástrico, na concentração de carbacol de -6 M ($43,2 \pm 6,3\%$ vs. $63,2 \pm 5,5\%$), e uma diminuição na CE50 de carbacol: $-5,8$ M [$(-6,0$ M) – $(-5,6$ M)] vs. $-6,3$ M [$(-6,5$ M) – $(-6,1$ M)]. Em comparação ao grupo CQX, o grupo CQX+ATN apresentou, de forma significativa ($p < 0,05$), uma redução no ganho de peso ($-27,3 \pm 3,5$ g vs. $-43,3 \pm 6,2$ g), juntamente com uma diminuição no esvaziamento gástrico (AUC $20.360,17 \pm 1.970,9$ $\mu\text{g} \times \text{min/mL}$ vs. $12.579,2 \pm 785,4$ $\mu\text{g} \times \text{min/mL}$), redução na porcentagem de contração de tiras de fundo gástrico, na concentração de carbacol de -6 M ($63,2 \pm 5,5\%$ vs. $46,5 \pm 5,7\%$), e um aumento na CE50 de carbacol: $-6,3$ M [$(-6,5$ M) – $(-6,1$ M)] vs. $-5,7$ M [$(-5,8$ M) – $(-5,7$ M)]. Em comparação ao grupo CQX, o grupo VGX+CQX mostrou, de forma significativa ($p < 0,05$), uma diminuição no índice de caquexia ($38,5 \pm 2,1\%$ vs. $32,4 \pm 1,7\%$), juntamente com uma diminuição no esvaziamento gástrico (AUC $20.360,17 \pm 1.970,9$ $\mu\text{g} \times \text{min/mL}$ vs. $13.414,0 \pm 1.112,9$ $\mu\text{g} \times \text{min/mL}$), redução na porcentagem de contração de tiras isoladas de fundo gástrico, na concentração de carbacol de -6 M ($63,2 \pm 5,5\%$ vs. $31,2 \pm 4,7\%$), e um aumento na CE50 de carbacol: $-6,3$ M [$(-6,5$ M) – $(-6,1$ M)] vs. $-5,7$ M [$(-5,8$ M) – $(-5,3$ M)]. Em comparação ao grupo CQX, o grupo CQX+WIN apresentou, de forma significativa ($p < 0,05$), uma redução no índice de caquexia ($38,5 \pm 2,1\%$ vs. $25,8 \pm 2,7\%$), juntamente com uma diminuição no esvaziamento gástrico (AUC $20.360,17 \pm 1.970,9$ $\mu\text{g} \times \text{min/mL}$ vs. $10.965,4 \pm 1.392,3$ $\mu\text{g} \times \text{min/mL}$), redução na porcentagem de contração de tiras isoladas de fundo gástrico, na concentração de carbacol de -6 M ($63,2 \pm 5,5\%$ vs. $38,2 \pm 3,9\%$), e um aumento na CE50 de carbacol: $-6,3$ M [$(-6,5$ M) – $(-6,1$ M)] vs. $-5,6$ M [$(-5,9$ M) – $(-5,5$ M)]. **CONCLUSÕES:** Concluiu-se, portanto, que a sinalização simpática em receptores β_1 está envolvida na dismotilidade gástrica, enquanto que o nervo vago e a via endocanabinoide estão relacionados com a regulação do índice de caquexia e da dismotilidade gástrica de ratos com caquexia induzida por células AH-130.

Palavras-chave: Caquexia associada ao câncer; Motilidade gastrointestinal; β_1 -adrenérgico; Nervo vago; Sistema endocanabinoide.

CAVALCANTE, M. L. de S. Vagal and β -adrenergic and cannabinoid receptor involvement in the acceleration of gastric emptying induced by Yoshida AH-130 cells in rats [dissertação]. Piauí: Programa de Pós-graduação em Farmacologia, Universidade Federal do Piauí; 2019.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Cancer-associated cachexia is characterized by a significant reduction in body weight as a result of skeletal muscle atrophy, which presents alterations in the cardiovascular and gastrointestinal systems, such as activation of the sympathetic nervous system, constipation due to gastrointestinal obstruction, and paradoxical elevation in concentrations of ghrelin. **AIM:** to investigate the vagal and β -adrenergic and cannabinoid receptors involvement in the gastrointestinal alterations of rats with cachexia, induced by Yoshida AH-130 cells. **MATERIAL AND METHODS:** The experimental model of cachexia (CQX) was induced by intraperitoneal inoculation of Yoshida AH-130 cells (10^8) in Wistar rats. General physiological and gastric alterations were analyzed. In order to elucidate the mechanisms involved, it was investigated the role of adrenergic signaling in β 1-receptors, in which the animals with cachexia were dosed daily with atenolol (ATN) (20 mg/kg, v.o.). Next, the involvement of the parasympathetic neural pathways was investigated, in which the animals with cachexia were previously submitted to subdiaphragmatic truncal vagotomy (VGX). Finally, we investigated the role of endocannabinoid pathways, in which the animals with cachexia were dosed daily with win 55,212-2 (WIN) (2 mg/kg, s.c.). **RESULTS:** Compared to the Control group, the CQX group had a significant ($p < 0.05$) reduction in body weight gain (11.2 ± 1.3 g vs. -27.3 ± 3.5 g), increase in cachexia index ($0.1 \pm 0.5\%$ vs. $38.5 \pm 2.1\%$), and reduction in food intake on 5th day (25.1 ± 0.7 g vs. 15.0 ± 0.7 g), 6th day (25.0 ± 2.1 g vs. 15.9 ± 1.2 g), and 7th day (27.7 ± 1.2 g vs. 12.9 ± 0.9 g), together with an increased gastric emptying (AUC 12349.8 ± 890.5 $\mu\text{g} \times \text{min} / \text{mL}$ vs. 20360.17 ± 1970.9 $\mu\text{g} \times \text{min} / \text{mL}$), increased contraction percentage of gastric fundus strips at the carbachol concentration of -6 M ($43.2 \pm 6.3\%$ vs. $63.2 \pm 5.5\%$), and decrease in carbachol EC50: -5.8 M [$(-6.0$ M) $(-5.6$ M)] vs. -6.3 M [$(-6.5$ M) $(-6.1$ M)]. Compared to the CQX group, the CQX + ATN group showed a significant ($p < 0.05$) decrease in weight gain (-27.3 ± 3.5 g vs. -43.3 ± 6.2 g), together with a decrease in gastric emptying (AUC 20360.17 ± 1970.9 $\mu\text{g} \times \text{min} / \text{mL}$ vs. 12579.2 ± 785.4 $\mu\text{g} \times \text{min} / \text{mL}$), reduction in the percentage of contraction of gastric fundus strips at the carbachol concentration of -6 M ($63.2 \pm 5.5\%$ vs. $46.5 \pm 5.7\%$), and increase in carbachol EC50: -6.3 M [$(-6.5$ M) $(-6.1$ M)] vs. -5.7 M [$(-5.8$ M) $(-5.7$ M)]. Compared to the CQX group, the VGX + CQX group showed a significant ($p < 0.05$) reduction in the cachexia index ($38.5 \pm 2.1\%$ vs. $32.4 \pm 1.7\%$), along with a decrease in gastric emptying (AUC 20360.17 ± 1970.9 $\mu\text{g} \times \text{min} / \text{mL}$ vs. $13,414.0 \pm 1,112.9$ $\mu\text{g} \times \text{min} / \text{mL}$), reduction in the percentage contraction of gastric fundus strips at the carbachol concentration of -6 M ($63.2 \pm 5.5\%$ vs. $31.2 \pm 4.7\%$) and increase in carbachol EC50: -6.3 M [$(-6.5$ M) $(-6.1$ M)] vs. -5.7 M [$(-5.8$ M) $(-5.3$ M)]. Compared to the CQX group, the CQX + WIN group had a significant ($p < 0.05$) reduction in the cachexia index ($38.5 \pm 2.1\%$ vs. $25.8 \pm 2.7\%$), along with a decrease in gastric emptying (AUC 20360.17 ± 1970.9 $\mu\text{g} \times \text{min} / \text{mL}$ vs. 10965.4 ± 1392.3 $\mu\text{g} \times \text{min} / \text{mL}$), reduction in the percentage of contraction of gastric fundus strips at the carbachol concentration of -6 M ($63.2 \pm 5.5\%$ vs. $38.2 \pm 3.9\%$), and increase in carbachol EC50: -6.3 M [$(-6.5$ M) $(-6.1$ M)] vs. -5.6 M [$(5.9$ M) $(-5.5$ M)]. **CONCLUSIONS:** It was concluded, therefore, that sympathetic signaling at β 1 receptors is involved in gastric dysmotility, whereas the vagus nerve and endocannabinoid pathway are related to the regulation of cachexia index and gastric dysmotility of rats with cachexia induced by AH-130 cells.

Keywords: Cancer cachexia; Gastrointestinal motility; β 1-adrenergic; Vagus nerve; Endocannabinoid system.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURAS

Figura 1 – Estágios da caquexia associada ao câncer e as respectivas alterações.....	31
Figura 2 – Alterações funcionais no trato gastrointestinal decorrentes da caquexia.....	33
Figura 3 – Sinalização colinérgica de contração do músculo liso gastrointestinal.	35
Figura 4 – Liberação de grelina por meio da ativação de receptores adrenérgicos β_1	37
Figura 5 – Vias diretas e indiretas de contração do músculo liso gastrointestinal reguladas pela grelina e outros peptídeos sinalizadores, como a motilina.	38
Figura 6 – Sinalização endocanabinoide em neurônios pré-sinápticos e pós-sinápticos.	40
Figura 7 – Estrutura química do acetaminofeno.....	41
Figura 8 – Arquitetura neuronal do sistema nervoso entérico e controle da motilidade.	43
Figura 9 – Interações das células intersticiais de Cajal e neurônios nitrérgicos com células de musculo liso do trato gastrointestinal.	44
Figura 10 – Procedimento para melhora da viabilidade das células tumorais AH-130	51
Figura 11 – Modelo experimental de indução de caquexia.....	52
Figura 12 – Delineamento experimental para os grupos “Controle” e “Caquexia”.	53
Figura 13 – Delineamento experimental para o grupo “Atenolol” e “Caquexia + Atenolol”. ..	54
Figura 14 – Desenho experimental para o grupo “Vagotomia” e “Vagotomia + Caquexia”..	55
Figura 15 – Representação anatômica do procedimento de vagotomia subdiafragmática.....	56
Figura 16 – Estrutura química do win 55,212-2.....	57
Figura 17 – Delineamento experimental para o grupo “Win” e “Caquexia + Win”.	58
Figura 18 – Procedimento para a retirada do líquido tumoral e pesagem dos animais	60

Figura 19 – Curva de regressão linear (absorbância vs. concentração) das soluções-padrão de acetaminofeno.....	67
Figura 20 – Representação das etapas realizadas para análise do esvaziamento gástrico.....	68
Figura 21 – Procedimento para obtenção das tiras de fundo gástrico e segmentos de duodeno.	70
Figura 22 – Sistema empregado no estudo da resposta contrátil de órgãos isolados.	71
Figura 23 – Etapas de estabilização e contração de órgãos <i>in vitro</i> , ao estímulo eletromecânico, com cloreto de potássio, e farmacomecânico cumulativo com carbacol.	72
Figura 24 – Representação esquemática do ensaio para detecção de citocinas.	78
Figura 25 – Etapas experimentais referentes à análise de neurônios mioentéricos.....	80
Figura 26 – Perfil de consumo alimentar de ratos com caquexia induzida.....	84
Figura 27 – Delta de peso corporal e Índice de caquexia dos animais com caquexia induzida.	85
Figura 28 – Concentrações séricas de acetaminofeno determinadas a partir de variações volumétricas nas amostras de soro.	86
Figura 29 – Marcadores bioquímicos de função hepática de ratos normais após a administração da solução teste de acetaminofeno.	87
Figura 30 – Concentrações séricas de acetaminofeno de ratos normais submetidos a uma modulação negativa prévia da volemia.	88
Figura 31 – Perfil de esvaziamento gástrico de ratos com caquexia.....	89
Figura 32 – Contratilidade de tiras isoladas de fundo gástrico de ratos com caquexia.....	91
Figura 33 – Registros originais da contratilidade <i>in vitro</i> de tiras de fundo gástrico de ratos com caquexia.	92
Figura 34 – Contratilidade de segmentos de duodeno de ratos com caquexia.....	93
Figura 35 - Registros originais da contratilidade <i>in vitro</i> de segmentos de duodeno de ratos com caquexia.	95

Figura 36 – Concentrações de citocinas em fundo gástrico de ratos com caquexia.....	96
Figura 37 – Consumo alimentar de ratos com caquexia induzida, e previamente submetidos às administrações diárias com atenolol.	97
Figura 38 – Variação no peso corporal e índice de caquexia de ratos com caquexia induzida, e previamente submetidos às administrações diárias com atenolol.....	99
Figura 39 – Perfil de esvaziamento gástrico de ratos com caquexia induzida, e previamente submetidos às administrações diárias com atenolol.	100
Figura 40 – Contratilidade de tiras isoladas de fundo gástrico de ratos com caquexia induzida, e administrados previamente com atenolol.	102
Figura 41 – Registros originais da contratilidade <i>in vitro</i> de tiras de fundo gástrico de ratos com caquexia, submetidos às administrações diárias de atenolol.	103
Figura 42 – Consumo alimentar de ratos com caquexia induzida, e previamente submetidos à vagotomia troncular subdiafragmática.	104
Figura 43 – Variação do peso corporal e índice de caquexia de ratos com caquexia induzida, e previamente submetidos à vagotomia troncular subdiafragmática.	106
Figura 44 – Perfil de esvaziamento gástrico de ratos com caquexia induzida, e submetidos previamente à vagotomia troncular subdiafragmática.	107
Figura 45 – Contratilidade de tiras isoladas de fundo gástrico de ratos com caquexia induzida, e submetidos previamente à vagotomia subdiafragmática.	109
Figura 46 – Registros originais da contratilidade <i>in vitro</i> de tiras isoladas de fundo gástrico de ratos com caquexia induzida, e submetidos previamente à vagotomia subdiafragmática.	110
Figura 47 – Consumo alimentar de ratos com caquexia induzida, e previamente submetidos às administrações diárias com win 55,212-2.	111
Figura 48 – Variação do peso corporal e índice de caquexia de ratos com caquexia induzida, e previamente submetidos às administrações diárias com win 55,212-2.	113
Figura 49 – Perfil de esvaziamento gástrico de ratos com caquexia induzida, e previamente submetidos às administrações diárias com win 55,212-2.....	114

Figura 50 – Contratilidade de tiras isoladas de fundo gástrico de ratos com caquexia induzida, e previamente submetidos às administrações diárias com win 55,212-2.	116
Figura 51 – Registros originais da contratilidade <i>in vitro</i> de tiras isoladas de fundo gástrico de ratos com caquexia induzida, e submetidos previamente às administrações diárias de win 55,212-2.....	117
Figura 52 – Esquema dos possíveis mecanismos envolvidos nas alterações fisiológicas e gástricas em ratos com caquexia induzida por células de Yoshida AH-130.	132
Figura 53 – Densidade global de neurônios mioentéricos de ratos com caquexia induzida.	136

QUADROS

Quadro 1 – Fórmulas utilizadas para a determinação do consumo alimentar.....	59
Quadro 2 – Fórmula empregada para o cálculo do índice de caquexia (IC).....	60
Quadro 3 – Diluições da solução padrão para a construção da curva de calibração.....	66
Quadro 4 – Fórmulas empregadas para a determinação das concentrações de acetaminofeno nas amostras-teste.....	68
Quadro 5 – Compostos utilizados no preparo da solução nutritiva de Tyrode.....	69
Quadro 6 – Soluções de carbacol utilizadas e o respectivo modo de preparo.....	73
Quadro 7 – Concentrações cumulativas de carbacol e o respectivo volume adicionado.....	74
Quadro 8 – Fórmulas empregadas para a determinações das tensões relativas à cada concentração de carbacol.....	74
Quadro 9 – Diluição das soluções-padrão para as citocinas determinadas.....	76
Quadro 10 – Compostos utilizados no preparo da solução nutritiva de Krebs.....	79
Quadro 11 – Fórmula empregada para a determinação da densidade neuronal.....	81
Quadro 12 – Síntese dos principais resultados obtidos.....	131

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AC	Adenilil ciclase
Ac	Anticorpo
ACh	Acetilcolina
ACh M3	Receptor muscarínico de acetilcolina do tipo m3
AKT	Proteína quinase B
ATN	Atenolol
ATP	Trifosfato de adenosina
AUC	Área sob a curva
BAC	Biossuceptometria
BMI	Índice de massa corporal
BSA	Albumina sérica bovina
CaM	Calmodulina
cAMP	Monofosfato cíclico de adenosina
CBR 1 / 2	Receptor endocanabinoide tipo 1 / 2
CCh	Carbacol
CE50	Concentração efetiva que ocasiona 50% da resposta máxima
ChAT	Enzima colina acetiltransferase
C_{max}	Concentração máxima
CQX	Caquexia
CQX + WIN	Caquexia + Win 55,212-2
CQX+ATN	Caquexia + Atenolol
CVLM	Medula ventrolateral caudal
DAG	Diacilglicerol
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMV	Núcleo motor dorsal do nervo vago
DN	Densidade neuronal
DNA	Ácido desoxirribonucleico
e.p.m.	Erro padrão da média
ER	Retículo endoplasmático
ERK	Proteína quinase relacionada aos sinais extracelulares

FC	Fator de calibração
GDP	Difosfato de guanosina
GE	Esvaziamento gástrico
gf	Gramma-força
GHSR1a	Receptor tipo 1a do secretagogo do hormônio do crescimento
GPCR	Receptor acoplado à proteína G
GRLN-R	Receptor de grelina
GTP	Trifosfato de guanosina
Gγ, Gβ, Gα	Subunidades α , β e γ da proteína G
HCN	Nucleotídeos cíclicos e ativados por hiperpolarização
HRP	Horseradish peroxidase
i.p.	Intraperitoneal
IC	Índice de caquexia
ICC	Célula intersticial de Cajal
IL-1β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina seis
IL-8	Interleucina oito
IML	Coluna intermediolateral da medula espinhal
INF-γ	Interferon γ
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
IP3	Inositol-1,4,5-trifosfato
IPAN	Neurônio aferente intrínseco primário
IR	Receptor de insulina
M cell	Célula secretora de motilina
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MLC	Cadeia leve de miosina
MLCK	Proteína quinase da cadeia leve de miosina
MLCP	Fosfatase da cadeia leve de miosina
MMC	Complexo motor migratório
mRNA	RNA mensageiro
mTOR	Receptor do alvo mecanístico da rifampicina
NADH	Dinucleotídeo adenina nicotinamida reduzida
NBT	Nitroblue tetrazolium

NF-κB	Fator nuclear κ B
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
NPY	Neuropeptídeo Y
NTS	Núcleo do trato solitário
P/D1 cell	Células secretoras de grelina em humanos
PBS	Tampão salina-fosfato
PGE₂	Prostaglandina E2
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinase
PIF	Fator indutor de proteólise
PIP₂	Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato
PKA	Proteína quinase A
PKC	Proteína quinase C
PLC-β1	Fosfolipase C tipo beta 1
PVN	Núcleo paraventricular do hipotálamo
rcf	Força centrífuga relativa
RMI	Imagem de ressonância magnética
rpm	Rotação por minuto
RVLM	Medula ventrolateral rostral
s.c.	Subcutâneo
Ser¹⁹	Serina
SMC	Célula muscular lisa
SNC	Sistema nervoso central
SNE	Sistema nervoso entérico
SNS	Sistema nervoso simpático
SP	Substância P
TGI	Trato gastrintestinal
TGO / AST	Transaminase glutâmico oxalacética / aspartato aminotransferase
TGP / ALT	Transaminase glutâmico pirúvica / alanina aminotransferase
T_{max}	Tempo relacionado às concentrações máximas
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TRPV	Receptor vaniloide de potencial transiente
UCP-1	Proteína de desacoplamento tipo 1

v.o.	Via oral
VGX	Vagotomia
VGX+CQX	Vagotomia + Caquexia
VIP	Peptídeo intestinal vasoativo
WIN	Win 55,212-2
X/A cell	Células secretoras de grelina em ratos
β1R	Receptor beta-1 adrenérgico
GIP	Polipeptídeo gástrico inibitório
GLUT 1/4/5	Transportador tipo 1, 4 e 5 de glicose
T_{1/2,GE}	Tempo de metade do esvaziamento gástrico
5-HT	5-hidroxitriptamina
5-HT 4 / 3	Receptor de 5-hidrotriptamina tipo 4 e tipo 3

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	26
1.1	Problematização	26
1.2	Modelo de caquexia induzida por células de Yoshida AH-130	28
1.3	Aspectos fisiopatológicos e clínicos gerais da caquexia.....	29
1.4	Repercussões da caquexia sobre a função do trato gastrintestinal e a ingestão alimentar	32
1.5	Regulação da motilidade gástrica pelo eixo cérebro-TGI	34
1.6	Envolvimento de componentes neuroendócrinos durante a caquexia.....	36
1.7	Modulação de funções fisiológicas pelo sistema endocanabinoide.....	39
1.8	Avaliação do esvaziamento gástrico pelo acetaminofeno	41
1.9	Efeitos da caquexia sobre componentes do sistema nervoso entérico	43
2	OBJETIVOS	47
2.1	Objetivo geral	47
2.2	Objetivos específicos.....	47
3	MATERIAL E MÉTODOS	49
3.1	Animais experimentais.....	49
3.2	Aspectos éticos e legais da pesquisa	49
3.3	Modelo experimental de caquexia induzida por células de yoshida AH-130.....	50
3.3.1	Melhoramento da viabilidade das células de Yoshida AH-130	50
3.3.2	Indução de caquexia através de inoculação das células tumorais viáveis.....	51
3.4	Delineamento e abordagens experimentais	53

3.4.1	Investigação de alterações fisiológicas e gastrintestinais de ratos com caquexia induzida por células AH-130.....	53
3.4.2	Investigação da participação de receptores β 1-adrenérgicos sobre alterações fisiológicas e gástricas de ratos com caquexia induzida	54
3.4.2.1	<i>Administração de atenolol.....</i>	54
3.4.3	Investigação do envolvimento parassimpático via nervo vago sobre alterações fisiológicas e gástricas de ratos com caquexia induzida	55
3.4.3.1	<i>Protocolo cirúrgico de vagotomia troncular subdiafragmática.</i>	56
3.4.4	Investigação do papel das vias endocanabinoides sobre alterações fisiológicas e gástricas de ratos com caquexia induzida.....	57
3.4.4.1	<i>Administração de win 55,212-2.....</i>	58
3.5	Protocolos experimentais	59
3.5.1	Análise do perfil de consumo alimentar.....	59
3.5.2	Avaliação da variação de peso corporal	59
3.5.3	Determinação do Índice de caquexia (IC%).....	60
3.5.4	Validação do teste de absorção de acetaminofeno como método de estudo do esvaziamento gástrico.....	61
3.5.4.1	<i>Investigação do efeito de variações volumétricas nas amostras-testes sobre a sensibilidade do teste de absorção de acetaminofeno.....</i>	61
3.5.4.2	<i>Investigação do efeito da administração da solução teste de acetaminofeno sobre os marcadores bioquímicos de função hepática de ratos.....</i>	62
3.5.4.3	<i>Investigação do efeito de modificações negativas prévias da volemia sobre o esvaziamento gástrico de ratos normais</i>	63
3.5.5	Avaliação <i>in vivo</i> do processo de esvaziamento gástrico.....	64
3.5.5.1	<i>Etapa pré-analítica: administração de acetaminofeno e coletas de sangue.....</i>	64
3.5.5.2	<i>Etapa analítica: processamento das amostras.....</i>	65
3.5.5.3	<i>Curva de calibração da solução padrão.....</i>	66
3.5.5.4	<i>Etapa pós-analítica: determinação dos resultados.....</i>	68
3.5.6	Avaliação <i>in vitro</i> da responsividade de órgãos gastrintestinais ao carbacol.....	69
3.5.6.1	<i>Obtenção de tiras longitudinais de fundo de estômago</i>	69
3.5.6.2	<i>Obtenção de segmentos de duodeno</i>	70
3.5.6.3	<i>Montagem das tiras de fundo gástrico e segmentos de duodeno no sistema.....</i>	71
3.5.6.4	<i>Preparo das soluções de trabalho.....</i>	73
3.5.6.5	<i>Contrações dos órgãos ao estímulo cumulativo com carbacol.....</i>	73
3.5.6.6	<i>Determinação dos resultados.....</i>	74

3.5.7	Coleta de amostras de fundo gástrico para análises <i>in vitro</i>	75
3.5.8	Medida de citocinas em fundo gástrico	75
3.5.8.1	<i>Preparo das amostras (Samples)</i>	75
3.5.8.2	<i>Diluição do anticorpo primário ou anticorpo de captura (Capture Ac)</i>	75
3.5.8.3	<i>Preparo do padrão (Standard)</i>	76
3.5.8.4	<i>Plaqueamento do padrão e das amostras</i>	76
3.5.8.5	<i>Preparo do anticorpo de detecção (Detection Ac)</i>	77
3.5.8.6	<i>Preparo dos compostos amplificadores de sinal: estreptoavidina-HRP e substrato</i>	77
3.5.8.7	<i>Determinação dos resultados</i>	77
3.5.9	Análise da densidade de neurônios mioentéricos.....	78
3.5.9.1	<i>Coleta dos órgãos gastrintestinais</i>	78
3.5.9.2	<i>Preparo, lavagem dos órgãos e acondicionamento no meio de incubação</i>	79
3.5.9.3	<i>Confecção das lâminas em microscopia estereoscópica</i>	80
3.5.9.4	<i>Análise das lâminas em microscopia óptica e cálculo dos resultados</i>	81
3.6	Fármacos, reagentes e células tumorais AH-130	82
3.7	Análise estatística	82
4	RESULTADOS	84
4.1	Caracterização de alterações fisiológicas de ratos com caquexia	84
4.1.1	Variação do consumo alimentar de ratos com caquexia	84
4.1.2	Variação de peso corporal e Índice de caquexia (IC%) dos animais experimentais com caquexia induzida por células de Yoshida AH-130	85
4.2	Validação do teste de absorção de acetaminofeno como método de estudo do esvaziamento gástrico	86
4.2.1	Efeito de variações volumétricas nas amostras-testes sobre a sensibilidade do teste de absorção de acetaminofeno.	86
4.2.2	Efeito da administração da solução teste de acetaminofeno sobre os marcadores bioquímicos de função hepática de ratos.....	87
4.2.3	Efeito de variações negativas prévias da volemia sobre o esvaziamento gástrico de ratos	88
4.3	Caracterização de alterações gastrintestinais de ratos com caquexia	89
4.3.1	Perfil de esvaziamento gástrico <i>in vivo</i> de ratos com caquexia induzida.....	89

4.3.2	Perfil de contratilidade <i>in vitro</i> de tiras isoladas de fundo gástrico de ratos com caquexia ao estímulo colinérgico com carbacol.....	90
4.3.3	Perfil de contratilidade <i>in vitro</i> de segmentos de duodeno de ratos com caquexia ao estímulo colinérgico com carbacol.....	93
4.3.4	Concentrações de citocinas em fundo gástrico de ratos com caquexia.....	96
4.4	Participação de receptores β1-adrenérgicos sobre alterações fisiológicas e gástricas de ratos com caquexia	97
4.4.1	Efeito da administração de atenolol sobre o consumo alimentar de ratos com caquexia induzida.....	97
4.4.2	Efeito da administração de atenolol sobre a variação de peso corporal e índice de caquexia (IC%) de ratos com caquexia induzida	98
4.4.3	Efeito da administração de atenolol sobre o processo de esvaziamento gástrico <i>in vivo</i> de ratos com caquexia induzida.....	100
4.4.4	Efeito da administração de atenolol sobre o perfil de contratilidade <i>in vitro</i> de tiras isoladas de fundo gástrico de ratos com caquexia induzida.....	101
4.5	Envolvimento de vias neurais parassimpáticas sobre alterações fisiológicas e gástricas de ratos com caquexia	104
4.5.1	Efeito da vagotomia troncular subdiafragmática sobre o consumo alimentar de ratos com caquexia induzida.....	104
4.5.2	Efeito da vagotomia subdiafragmática total sobre a variação de peso corporal e índice de caquexia (IC %) de ratos com caquexia induzida.....	105
4.5.3	Efeito da vagotomia troncular subdiafragmática sobre o processo de esvaziamento gástrico <i>in vivo</i> de ratos com caquexia induzida.....	107
4.5.4	Efeito da vagotomia troncular subdiafragmática sobre o perfil de contratilidade <i>in vitro</i> de tiras isoladas de fundo gástrico de ratos com caquexia induzida.....	108
4.6	Papel das vias endocanabinoides sobre alterações fisiológicas e gástricas de ratos com caquexia	111
4.6.1	Efeito da administração de win 55,212-2 sobre o consumo alimentar de ratos com caquexia induzida.....	111
4.6.2	Efeito da administração de win 55,212-2 sobre a variação de peso corporal de ratos com caquexia induzida.....	112
4.6.3	Efeito da administração de win 55,212-2 sobre o processo de esvaziamento gástrico <i>in vivo</i> de ratos com caquexia induzida.....	114
4.6.4	Efeito da administração de win 55,212-2 sobre o perfil de contratilidade <i>in vitro</i> de tiras isoladas de fundo gástrico de ratos com caquexia induzida.....	115

5	DISCUSSÃO	119
6	CONCLUSÕES	134
7	PERSPECTIVAS DE NOVOS ESTUDOS	135
	REFERÊNCIAS	137
	ANEXO A – MAPA DOS TEMPOS UTILIZADO NO PROTOCOLO DE ESVAZIAMENTO GÁSTRICO.....	165
	ANEXO B – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ	166

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 Problematização

O termo “caquexia”, etimologicamente, originou-se do grego “*kakos*” e “*hexia*” (ARGILÉS et al., 2014), e refere-se a uma síndrome complexa, caracterizada por perda de peso e de massa muscular, assim como um desgaste de tecido adiposo, o que resulta em um mal prognóstico (VON HAEHLING; ANKER; ANKER, 2016; AOYAGI et al., 2015).

Aproximadamente 80% dos pacientes com câncer avançado desenvolvem caquexia (SCOTT et al., 2016), porém essa porcentagem é variável dependendo do tipo de neoplasia (IWATA et al., 2016). Em associação com câncer, a caquexia é a causa de morte de cerca de 1/3 dos pacientes (ONESTI; GUTTRIDGE, 2014). Nestes casos, a atrofia muscular pode ocasionar complicações no tratamento antitumoral e óbito (KAZEMI-BAJESTANI; MAZURAK; BARACOS, 2016). Em idosos, as apresentações clínicas dessa relação são preditores para a ocorrência de mortalidade (BOURDEL-MARCHASSON et al., 2016).

Apesar de o tecido muscular esquelético ser o principal acometido no estado caquético, a síndrome também acomete outros órgãos e sistemas (PORPORATO, 2016). Dentre as complicações características da caquexia neoplásica, que diminuem a qualidade de vida, destacam-se aquelas que acometem os sistemas respiratório e cardiovascular (CAILLET et al., 2016), a exemplo da insuficiência cardíaca crônica, que apresenta-se como um distúrbio que afeta os sistemas renal, neuroendócrino e imunológico (OKOSHI et al., 2017).

Na caquexia ocorre uma liberação anormal de citocinas pró-inflamatórias e uma ativação do sistema nervoso simpático (SNS), os quais são fatores que contribuem para o balanço energético negativo patológico observado (COLLDÉN; TSCHOP; MÜLLER, 2017), bem como para a ocorrência de uma disfunção sistêmica (NARSALE; CARSON, 2014).

Nesse contexto, a função gastrointestinal também encontra-se bastante comprometida (ZIMMERS; FISHEL; BONETTO, 2016). Em relação ao trato gastrointestinal (TGI), observam-se problemas como congestão (VALENTOVA et al., 2016) e redução do fluxo sanguíneo intestinal (SANDEK et al., 2014), os quais limitam suas funções vitais.

Dentre as alterações no TGI, ocorrem desordens da digestão e da motilidade associadas com câncer, tais como anorexia, constipação, dor abdominal e obstrução intestinal, de modo que, nesses casos, o sistema nervoso entérico (SNE) apresenta algum grau de comprometimento, o que pode resultar em neuropatia (GODLEWSKI, 2010). É sabido que

mudanças nas células intersticiais de Cajal (ICC) são parcialmente responsáveis pela dismotilidade gastrointestinal induzida por tumores abdominais malignos (LI et al., 2015a).

Os casos de câncer em regiões do TGI superior, como o estômago, são caracterizados por uma elevada incidência de caquexia (FUJITSUKA; UEZONO, 2014), e a dismotilidade usualmente manifesta-se com um esvaziamento gástrico diminuído, que pode ser avaliado por métodos como: cintilografia, teste de absorção de carboidratos, ultrassonografia, ressonância magnética (RMI), teste de isótopos expirados, recuperação de corante marcado, determinação de volume gástrico residual, biossuceptometria (BAC), e teste de absorção de acetaminofeno (VAZQUEZ-SANDOVAL; GHAMANDE; SURANI, 2017; ALABRESI et al., 2015).

Curiosamente, ao nível de estômago, também é possível observar, de modo paradoxal, uma alta produção de grelina, o que pode ser analisado como um mecanismo compensatório para conter ou “tamponar” os sintomas da caquexia (PORPORATO, 2016). Esta proteína é principalmente secretada durante os estados de jejum, pelo estômago (BORNER et al., 2016) e exerce atividades que resultam, por exemplo, em um aumento da adiposidade (HEPPNER et al., 2014), bem como uma modulação positiva da motilidade gastrointestinal, o que diminui potencialmente a ocorrência de náuseas e vômitos (ROBERTS et al., 2013).

Não há tratamentos estabelecidos para a caquexia neoplásica (CHEN et al., 2015; STEWART COATS et al., 2016), embora estudos pré-clínicos e clínicos tenham mostrado os efeitos promissores de agentes, como os canabinoides, que tem um papel útil no controle dos sintomas associados ao câncer, como dor, náuseas e atrofia muscular, porém não como parte de um tratamento primário (KENYON; LIU; DALGLEISH, 2018). É notório, portanto, que os estudos, em sua maioria, são voltados para a elucidação dos mecanismos subjacentes às alterações no músculo esquelético, características da caquexia.

Contudo, o impacto sobre órgãos, como o estômago, necessita de maiores investigações, uma vez que vários mecanismos fisiopatológicos têm sido propostos, tais como inflamação, desregulação de componentes neuro-humorais, alterações da permeabilidade intestinal e microbiota, e perturbações no eixo cérebro-TGI (KOUTOURATSAS et al., 2019). Há evidências de que o sistema nervoso autônomo está envolvido na fisiopatogênese da caquexia, pois este componente envia, ao sistema nervoso central, alterações periféricas, e medeia parte das respostas metabólicas que ocorrem nos órgãos (LAVIANO et al., 2008).

Face às considerações expostas, o presente estudo foi desenvolvido com o intuito de investigar o envolvimento vagal e de receptores β -adrenérgicos e canabinoides nas alterações gastrointestinais de ratos com caquexia induzida por células de Yoshida AH-130.

1.2 Modelo de caquexia induzida por células de Yoshida AH-130

O uso de modelos experimentais, que assemelham-se ao quadro clínico apresentado na doença humana, tem sido uma ferramenta muito benéfica, pois possibilita o estudo da caquexia associada ao câncer em animais, através do transplante de células, agentes carcinógenos, ou por meio de técnicas de modificação genética que resultam em uma maior suscetibilidade ao desenvolvimento de câncer em ratos (BONETTO et al., 2016).

A maioria dos estudos envolvendo terapias anti-caquexia são realizadas em animais com um processo tumoral em desenvolvimento, tal como o modelo baseado em células de hepatoma-ascite de Yoshida (AH-130), o que facilita a tradução dos resultados para os indivíduos acometidos, uma vez que na prática clínica, o tratamento anticâncer é realizado assim quando o câncer é diagnosticado (TOLEDO et al., 2016).

Inicialmente, os tumores AH-130 foram considerados um modelo bem estabelecido de hepatoma sólido, induzido através da adição de p-dimetilamino-azo-benzeno (DAB) na dieta de ratos, durante 5 meses aproximadamente (YOSHIDA, 1951). Anos depois, a conversão das formas sólidas em um tumor ascítico líquido foi descrita por Yoshida (1956). A associação deste tumor com o desenvolvimento de caquexia foi, posteriormente, estabelecida por meio dos estudos de Tessitore, Bonelli e Baccino (1987), os quais apontaram uma perda pronunciada de massa muscular, por volta do oitavo e décimo dia, após a indução.

As células de Yoshida AH-130 correspondem a uma linhagem capaz de ocasionar o desenvolvimento rápido e agressivo do tumor (TSCHIRNER et al., 2011). Conforme evidenciado por trabalhos de pesquisa, estas células apresentam um crescimento típico em ratos, no entanto, as mesmas podem também ser inoculadas e mantidas em camundongos (MINERO et al., 2015).

O modelo celular de hepatoma-ascite é caracterizado pelo não surgimento de metástase, mas pela formação de um fluido ascítico no peritônio, no qual as células tumorais se desenvolvem de forma livre sem adesão aos órgãos, e multiplicam-se de modo linear até o sétimo dia, quando, então, a taxa de crescimento tumoral é reduzida e alcança um platô por volta do décimo segundo dia (PALUS et al., 2013).

Com sete dias decorridos da inoculação das células AH-130 é possível observar uma redução significativa na ingestão de alimentos e uma perda de peso, o que indica o início do desenvolvimento do fenótipo caquético (OHBUCHI et al., 2015). Após a etapa de

crescimento exponencial, que se inicia a partir do segundo dia, as células tumorais causam a morte dos animais após o decimo segundo dia da inoculação (MARZÁBAL et al., 1993).

No entanto, com o decorrer da proliferação das células tumorais, outras complicações tornam-se perceptíveis, tais como o desenvolvimento de anorexia, dismotilidade gastrintestinal, e diminuição da sobrevida (FUJITSUKA et al., 2011). Em animais submetidos ao modelo de caquexia associada ao câncer através de células de Yoshida, a perda de peso também está associada com uma redução significativa das concentrações plasmáticas de vitamina D, abaixo dos valores normais, e um aumento na expressão de receptores para o composto citado (CAMPERI et al., 2017; DEV et al., 2011).

Alterações em biomarcadores de vias catabólicas bem reconhecidas têm sido demonstradas em ratos inoculados com as células de Yoshida, as quais podem ser caracterizadas por uma ativação de autofagia, associada com modificações na massa e função cardíaca (MUSOLINO et al., 2016). Pesquisas científicas têm apontado a presença aumentada de p62, um marcador de autofagossomos, no músculo gastrocnemius de ratos infectados com células AH-130, sete dias após a inoculação (PENNA et al., 2013).

1.3 Aspectos fisiopatológicos e clínicos gerais da caquexia

A caquexia associada ao câncer é definida, de modo consensual, como uma síndrome, caracterizada por atrofia muscular, com ou sem perda de tecido adiposo, que não pode ser completamente revertida pelo suporte nutricional convencional (FEARON et al., 2011). Na caquexia relacionada ao câncer, dados obtidos de pesquisas enfatizam a etiologia multifatorial envolvida e destacam que a combinação de citocinas e/ou mediadores adicionais é responsável pelo fenótipo caquético (SCHAEFER et al., 2016).

Fatores pró-inflamatórios produzidos pelo hospedeiro, e fatores pró-caquéticos provenientes das células tumorais, como a dermicidina (ou fator indutor de proteólise, PIF), uma glicoproteína sulfatada encontrada na urina de pacientes com câncer de pâncreas, mama, ovário, pulmão, fígado e retal, e com uma perda de peso substancial, contribuem para a inflamação sistêmica e o hipercatabolismo (ANANDAVADIVELAN; LAGERGREN, 2016).

Os mediadores inflamatórios circulantes induzidos pelo câncer incluem o TNF, IL-6, IFN e IL-2, assim como aqueles que apresentam uma correlação com a caquexia bem estabelecida: IL-6, e os membros da superfamília do fator β de crescimento e transformação (activina A e o fator de diferenciação e crescimento, GDF-15) (LERNER et al., 2016).

Em modelo animal mostrou-se que a expressão de proteínas indutoras de apoptose, relacionadas com o TNF, pelas células tumorais pode causar caquexia (JOHNSTON et al., 2015). O TNF- α presente na caquexia pode ativar o fator de transcrição NF- κ B no músculo esquelético e levar à degradação de proteínas através da transcrição de genes que codificam os componentes envolvidos na via proteolítica ubiquitina-proteossomo (PATEL; PATEL, 2017).

Decorrente da ação das citocinas formadas durante os eventos inflamatórios, o ácido araquidônico, um componente das membranas celulares, é produzido a partir da clivagem dos fosfolípidios, e resulta na formação de eicosanoides com ação pró-inflamatória que contribui para o desenvolvimento da caquexia (WERNER et al., 2017).

Além dos fatores pró-caquéticos e citocinas pró-inflamatórias, evidências indicam que os componentes da maquinaria proteolítica, como a via da calpaína, proteossomos e lisossomos, também são bastante expressos na caquexia neoplásica, enquanto os sistemas envolvidos no controle endógeno do *turnover* proteico, como a calpastatina e as enzimas de desubiquitinação estão regulados negativamente (WING, 2016).

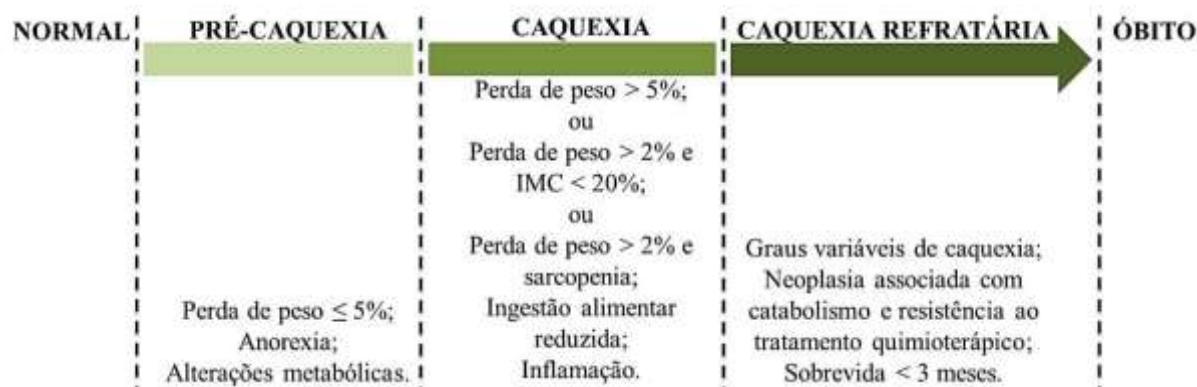
A caquexia, além dos casos de câncer, também pode ocorrer na síndrome da imunodeficiência adquirida, esclerose múltipla, doença pulmonar obstrutiva crônica, tuberculose, insuficiência cardíaca crônica, deficiência hormonal, polineuropatia amiloidótica familiar e envenenamento por mercúrio (FEARON; ARENDS; BARACOS, 2013).

Usualmente, porém nem sempre, observa-se um diminuído índice de massa corporal (*body mass index*, BMI) na caquexia (RENFRO et al., 2016). Porém, em alguns casos o BMI não é um fator prognóstico adequado, pois 40 a 60% dos casos de caquexia são caracterizados pela presença de sobrepeso, mesmo com tumores avançados (RYAN et al., 2016). Neste sentido, em um estudo clínico o diagnóstico de caquexia foi subestimado em 77% dos casos avaliados, por conta do bom *status* de performance e BMI normal (SUN; QUAN; YU, 2015).

Nesse sentido, estudos propuseram um sistema de classificação da caquexia baseado na incorporação de um prognóstico independente tanto do BMI quanto da porcentagem da perda de peso (MARTIN et al., 2015), ou relacionado diretamente com a ingestão alimentar, perda de peso, *status* de performance e alterações bioquímicas, com altas concentrações de proteína C reativa, leucocitose, hipoalbuminemia ou anemia (VIGANO et al., 2016).

De acordo com especialistas, a caquexia associada ao câncer pode envolver três estágios de relevância clínica, como apresentado na **Figura 1**: a pré-caquexia, caquexia e caquexia refratária (AVERSA; COSTELI; MUSCARITOLI et al., 2017). Essa doença envolve uma inflamação sistêmica e anorexia, as quais juntas levam a uma incapacidade física, reduzida qualidade de vida e sobrevivência diminuída (NAING et al., 2015).

Figura 1 – Estágios da caquexia associada ao câncer e as respectivas alterações.



Fonte: Adaptado de Fearon et al. (2011).

Em modelos experimentais, observou-se que a caquexia, quando associada às neoplasias, induziu disfunção cardíaca e alterações moleculares características de um processo patológico de remodelação com uma via anabólica de sinalização reduzida (SPRINGER et al., 2014), o que pode, conseqüentemente, prejudicar o coração e ocasionar insuficiência cardíaca (OKOSHI et al., 2017). Estudos também destacaram uma correlação entre a massa de ventrículo esquerdo e a massa corporal magra, de forma que o coração está sujeito às conseqüências similares (MOLFINO et al., 2014).

No fígado, o processo inflamatório assume a forma de hipertrofia e ativação de respostas de fase aguda (NARSALE et al., 2015). Também são observadas desregulações da hematopoese, anemia, trombocitose e imunossupressão (KALANTAR-ZADEH et al., 2013).

Dentre as alterações que ocorrem no tecido adiposo, destaca-se a lipólise funcional (TSOLI; SWARBRICK; ROBERTSON, 2016). Em modelos pré-clínicos, com a progressão da caquexia neoplásica, as células adiposas brancas convertem-se em células semelhantes ao tecido adiposo marrom, em um processo referido como “*browning*” (KIR et al., 2014). Estudos têm demonstrado que estas alterações estão relacionadas com uma ativação do sistema nervoso simpático (BRITO et al., 2007).

Tais células apresentam um elevado conteúdo mitocondrial e expressão aumentada de proteína de desacoplamento tipo 1 (UCP-1), responsável pelo aumento da termogênese (NEDERGAARD; CANNON, 2014). Diferentemente da obesidade e da síndrome metabólica, nas quais o aumento da termogênese representaria um potencial terapêutico, o “*browning*” no contexto do câncer exacerba a disfunção metabólica, aumenta a dissipação de energia e contribui para a progressão da caquexia relacionada ao câncer (PETRUZZELLI et al., 2014).

1.4 Repercussões da caquexia sobre a função do trato gastrintestinal e a ingestão alimentar

De modo geral, o consumo alimentar pode ser modulado periféricamente por fatores estimulatórios (orexigênicos) e inibitórios (anorexigênicos ou de saciedade), os quais ativam terminais neurais no trato gastrintestinal (ORIO et al., 2011). Ao curto prazo, essa modulação pode envolver peptídeos gastrintestinais sinalizadores (DOCKRAY, 2014), ou o grau de distensão gástrica, mediado por vias vagais aferentes (GUARINO et al., 2017).

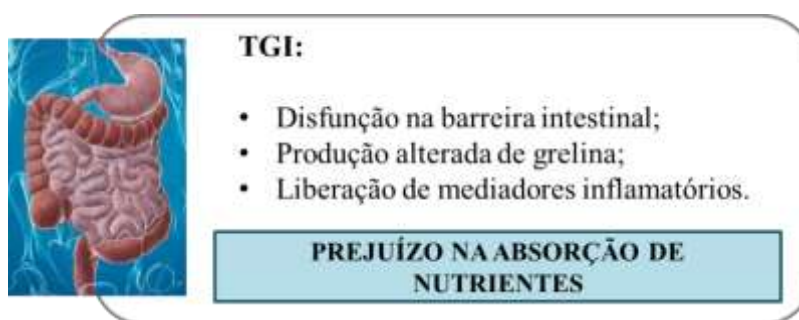
Durante e imediatamente após a ingestão alimentar, o estômago proximal sofre um relaxamento ocasionado por vias não adrenérgicas e não colinérgicas, e o volume gástrico sofre um aumento, porém sem elevação concomitante na pressão intraluminal (VERSCHUEREN et al., 2014). Durante o estado de jejum, as fibras eferentes do nervo vago mantem a atividade tônica das células musculares lisas do estômago proximal, e consequentemente o tônus do fundo gástrico (CAVALCANTE et al., 2018).

Nos casos de caquexia associada ao câncer, um efeito específico do tumor corresponde ao impacto mecânico sobre o trato digestivo, o qual pode reduzir a ingestão de alimento, o que, por sua vez, promove anorexia e um peso corporal diminuído (SCHCOLNIK-CABRERA et al., 2017). Além do efeito sobre o TGI, a ingestão alimentar diminuída também pode ser desencadeada pelos sinais da inflamação sistêmica, no cérebro e hipotálamo, decorrentes da caquexia (BURFEIND; MICHAELIS; MARKS, 2016).

Uma alta incidência de perda de peso também pode ser encontrada em tumores do trato gastrintestinal superior, tais como os cânceres de esôfago, pescoço, cabeça (com uma incidência de 70%) e, particularmente, do pâncreas e do estômago (com uma frequência acima de 80%) (TSOLI; ROBERTSON, 2013). Nos casos de câncer no pâncreas, a invasão tumoral pode obstruir o ducto pancreático e a segunda parte do duodeno, e resultar em sintomas como dor, estenose duodenal e constipação (TAN et al., 2014).

Além disso, alterações da função do TGI inferior contribuem com a severidade da caquexia, e tal fato é particularmente relevante em tumores do TGI, como provado em um modelo murino de câncer de cólon, com a cepa transgênica APC^{+/-min}, na qual a barreira intestinal foi desregulada juntamente com o crescimento do tumor, que resultou em aumento da inflamação sistêmica e da endotoxemia (KLEIN et al., 2013a). As manifestações da inflamação sistêmica envolvem efeitos, tais como prejuízos de absorção intestinal (ZIMMERS; FISHEL; BONETTO, 2016), como mostrado na **Figura 2**.

Figura 2 – Alterações funcionais no trato gastrointestinal decorrentes da caquexia.



Fonte: Adaptado de Argilés et al. (2014).

Além do câncer de cólon, um impacto mais amplo do intestino na caquexia está relacionado à microbiota intestinal (BINDELS; DELZENNE, 2013). Interessantemente, a severidade e a progressão da caquexia, em modelos murinos, podem ser moduladas pela colonização intestinal por diferentes cepas bacterianas (SCHIEBER et al., 2015).

O intestino humano contém cerca de trilhões de microrganismos, e prejuízos na diversidade da microbiota intestinal pode ocasionar disbiose e resultar em doenças complexas (ARYA; HU, 2018), caracterizadas, por exemplo, por um aumento no trânsito intestinal e atividade neuronal desregulada (MCVEY NEUFELD et al., 2013).

A relação entre microbiota intestinal e câncer tem sido investigada ao longo dos anos (DZUTSEV et al., 2017), porém somente em anos recentes estudos apontaram a existência de uma relação mútua entre a microbiota intestinal e alterações decorrentes, por exemplo, da caquexia associada ao câncer (BINDELS et al., 2018).

Estudos demonstraram que, em modelos pré-clínicos de caquexia associada ao câncer, tem sido observada a presença aumentada de bactérias do gênero *Enterobacteriaceae*, juntamente com um aumento da permeabilidade e diminuição na imunidade e renovação celular (BINDELS et al., 2016). Tais alterações foram correlacionadas com sinais e sintomas da caquexia, e, como consequência, foram observadas perturbações acentuadas na função e na morfologia da barreira intestinal (PÖTGENS et al., 2018).

Tem sido demonstrado também que injeções de endotoxinas, em baixas doses, ocasiona perda de peso, ao longo dos dias (HATTER et al., 2018), o que permitiu inferir que o desenvolvimento de abordagens terapêuticas direcionadas à microbiota intestinal pode representar uma alternativa promissora (ROY; TRINCHIERI, 2017).

1.5 Regulação da motilidade gástrica pelo eixo cérebro-TGI

O trato gastrintestinal recebe, através do sistema nervoso autônomo, uma inervação extrínseca dupla, que inclui uma divisão colinérgica (parassimpática), representada pelos nervos vagais e pélvicos, e uma divisão noradrenérgica (simpática), associada aos nervos esplâncnicos (KONTUREK et al., 2004).

O nervo vago desempenha um papel importante na mediação da interação entre o sistema nervoso central e o trato gastrintestinal, uma vez que este componente neural transmite, de forma coordenada, informações provenientes do TGI, ao núcleo do trato solitário (NTS), no tronco cerebral, e conseqüentemente, sinais eferentes, provenientes do núcleo motor dorsal do nervo vago (DMV), são emitidos, primariamente ao terço inferior do esôfago e ao estômago, para modular suas funções (TRAVAGLI; ANSEMI, 2016).

As fibras eferentes vagais transmitem estímulos tanto excitatórios, quanto inibitórios, ao músculo liso do TGI, e ao esfíncter pilórico, de forma que quando uma via excitatória é ativada, ocorre liberação de neurotransmissores, como acetilcolina e substância P (SP), dos terminais neurais vagais ao plexo mioentérico, no SNE, o que resulta em despolarização e produção de fortes contrações (LU et al., 2018). De forma oposta, quando uma via inibitória é ativada, ocorre a liberação de neurotransmissores, como peptídeo intestinal vasoativo (VIP) e óxido nítrico, que causam relaxamento do músculo liso (TAKAHASHI; OWYANG, 1995).

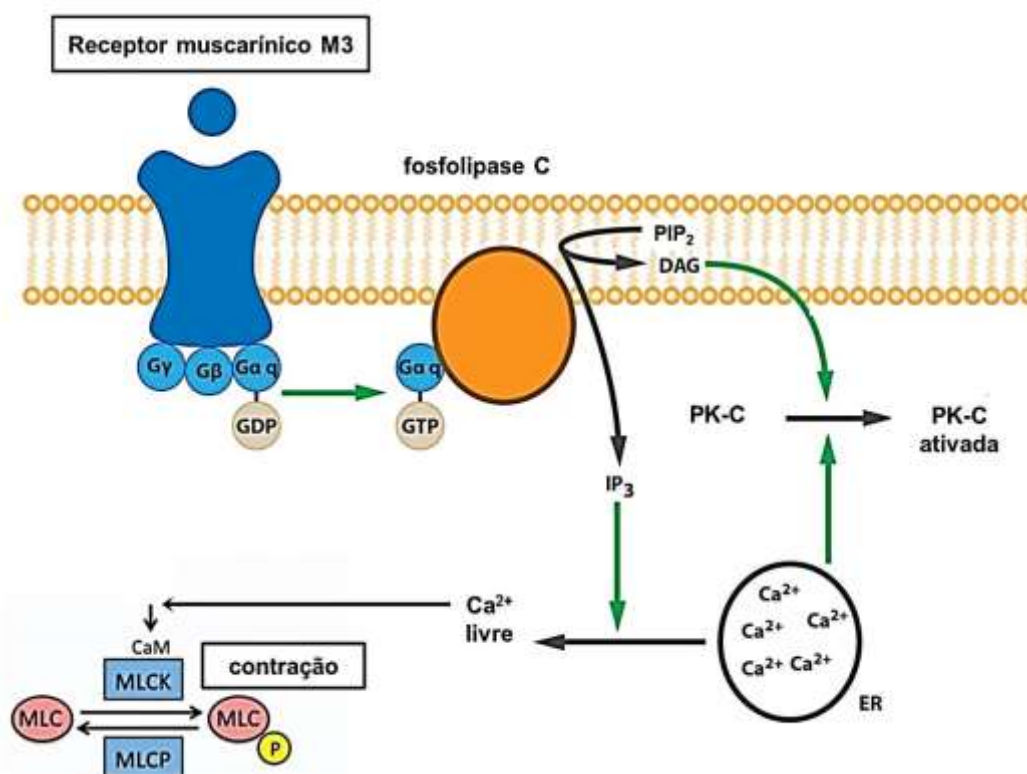
A acetilcolina é um importante neurotransmissor envolvido em funções no sistema nervoso central e periférico (PETER et al., 2016), as quais são mediadas por receptores nicotínicos e muscarínicos, nomeados segundo seus ligantes exógenos: nicotina e muscarina, respectivamente (DOROSTKAR; BOEHM, 2008).

Os receptores nicotínicos são canais iônicos, formados por cinco subunidades, que medeiam uma rápida despolarização da membrana plasmática de células pós-sinápticas (COPPOLA; DISNEY, 2018), enquanto que, em células pré-sinápticas, atuam na regulação da liberação de neurotransmissores (PEDERSEN; BERGQVIST; LARHAMMAR, 2019).

Os receptores muscarínicos são receptores acoplados a proteína G (GPCR's), presentes no SNC e órgãos periféricos, e compreendem cinco sub-tipos (M1 a M5) (PEDERSEN; BERGQVIST; LARHAMMAR, 2018). Dentre estes, o subtipo M3 medeia funções fisiológicas importantes, como a contração do músculo liso (GAUTAM et al., 2009). Este receptor conjuga-se à proteína G da família Gq e ativa segundos mensageiros que modulam funções em órgãos periféricos (JIANG et al., 2015).

No músculo liso gastrointestinal, a ativação de receptores muscarínicos M3 pela acetilcolina aumenta a atividade da enzima fosfolipase C beta 1 (PLC- β 1), a qual resulta na formação de inositol-1,4,5-trifosfato (IP₃), liberação de Ca²⁺, ativação da proteína quinase da cadeia leve de miosina (MLCK) dependente de Ca²⁺/calmodulina (CaM), e fosforilação do aminoácido serina (Ser¹⁹) na cadeia leve de miosina (MLC), que causa uma contração muscular inicial (MAHAVADI et al., 2018), conforme mostrado na **Figura 3**.

Figura 3 – Sinalização colinérgica de contração do músculo liso gastrointestinal.



Legenda: *ACh M3*: receptor muscarínico de acetilcolina do tipo m3. *G α* , *G β* , *G γ* : subunidades da proteína G. *DAG*: diacilglicerol. *GDP*: difosfato de guanosina. *GTP*: trifosfato de guanosina. *PIP₂*: fosfatidilinositol-4,5-bifosfato. *IP₃*: inositol-1,4,5-trifosfato. *PKC*: proteína quinase C. *ER*: retículo endoplasmático. *Ca²⁺*: íons cálcio. *P*: fósforo. *CaM*: calmodulina. *MLC*: cadeia leve de miosina. *MLCK*: quinase da cadeia leve de miosina. *MLCP*: fosfatase da cadeia leve de miosina. **Fonte:** Adaptado de Kim et al. (2016).

As contrações iniciais são sucedidas por contrações sustentadas, as quais são mediadas por vias distintas reguladas pelas enzimas RhoA e Rho quinase, de modo que a RhoA, sob a forma ativa ligada a GTP, resulta na ativação das enzimas Rho quinase 1 e 2 (HE et al., 2018), que inibem a fosfatase da cadeia leve de miosina (MLCP) (DE GODOY; RATTAN, 2011). Esta inibição reduz a atividade de fosfatase da MLCP e interfere na sua ligação à cadeia leve de miosina, o que resulta em uma contração sustentada (TOUYZ et al., 2018). Outras vias relacionadas envolvem a inibição da MLCP pela proteína quinase C (PKC), que mantém a contração, mediada pela fosforilação da MLC (HU; MAHAVADI; MURTHY, 2007).

Os neurônios do NTS também projetam-se para regiões do tronco cerebral envolvidas na regulação da atividade neuronal simpática, tais como a medula ventrolateral caudal (CVLM) e medula ventrolateral rostral (RVLM), cujos neurônios desempenham um papel importante no tônus simpático periférico (BÜLBÜL; SINEN, 2018).

As fibras na RVLM, juntamente com um subgrupo de neurônios no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), projetam-se diretamente para neurônios pré-ganglionares simpáticos dentro da coluna intermediolateral (IML) da medula espinhal, a qual inerva células noradrenérgicas no gânglio celíaco que inibem a motilidade do músculo liso gástrico (BROWNING; TRAVAGLI, 2014).

Os nervos simpáticos podem exercer suas ações na sinapse neuronal de duas formas: através da inibição da liberação de acetilcolina, por exemplo, em um plexo intramural, ou por meio da liberação direta de noradrenalina dos neurônios simpáticos, a qual hiperpolariza a membrana dos neurônios pós-sinápticos (LUNDGREN, 2000).

1.6 Envolvimento de componentes neuroendócrinos durante a caquexia

Uma ativação do sistema nervoso simpático está associada com o desenvolvimento de caquexia em pacientes com câncer (QUANJUN et al., 2013; RANPURIA et al., 2008), e alterações na sua atividade influenciam a secreção de peptídeos, a exemplo da grelina (HOSODA; KANGAWA, 2008), a qual é capaz de ligar-se em receptores no nervo vago (UENO; NAKAZATO, 2016).

A grelina é um peptídeo de 28 aminoácidos (ANDREWS, 2011), produzida e liberada por células oxínticas no estômago, chamadas de células tipo X/A em roedores, as quais são semelhantes às células tipo P/D1 em humanos, e correspondem à principal fonte responsável pelas concentrações plasmáticas de grelina circulante (MÜLLER et al., 2015). Este peptídeo desempenha um papel estimulatório no consumo alimentar por meio de ações no sistema nervoso central e em tecidos periféricos (MOLFINO; GIOIA; MUSCARITOLI, 2013).

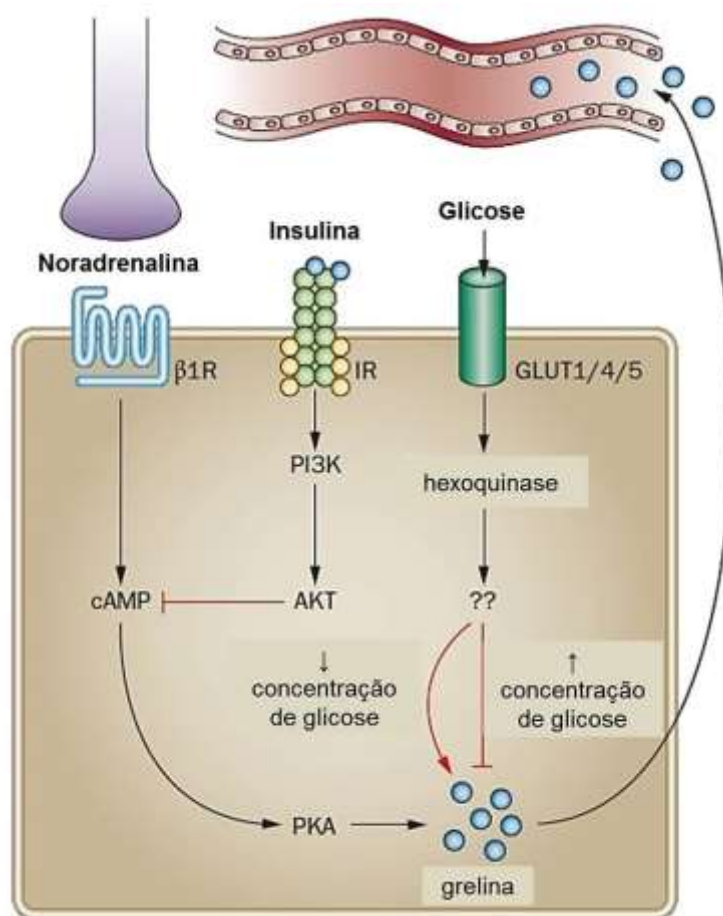
No cérebro, a grelina liga-se em receptores tipo 1a do secretagogo do hormônio do crescimento (GHSR1a), posteriormente renomeados para receptores de grelina, e designados pela sigla GRLN-R (DAVENPORT, et al., 2005), os quais são reguladores da ingestão alimentar, pois aumentam a expressão de neuropeptídeo Y (NPY) e peptídeo relacionado a Agouti no hipotálamo, e melhoram o apetite através da ação em receptores presentes em neurônios melanocortinérgicos (STEINMAN; DEBOER, 2013).

Embora os mecanismos que causam uma elevação das concentrações de grelina, nos casos de caquexia associada ao câncer, não estejam totalmente elucidados, este fato pode visto como um mecanismo compensatório em resposta à perda de peso e prejuízos no balanço energético, mas que não ocasiona um aumento na ingestão alimentar (KHATIB et al., 2018a).

Estudos sugerem que a liberação periférica de grelina é controlada por vias de sinalização parassimpática e simpática (DAVIS, 2018). Em pesquisa desenvolvida por Williams et al. (2003), mostrou-se que lesões induzidas à porção subdiafragmática do nervo vago eliminaram a liberação de grelina durante o estado de restrição alimentar. Outro trabalho, desenvolvido por Mundinger et al. (2006), reportou que o estímulo elétrico ou químico do sistema nervoso simpático estimulou a liberação de grelina em ratos anestesiados.

Em condições de jejum, e antes das refeições, as concentrações plasmáticas de grelina elevam-se em decorrência da ativação de receptores β_1 adrenérgicos (MANI et al., 2016), tal como representado na **Figura 4**.

Figura 4 – Liberação de grelina por meio da ativação de receptores adrenérgicos β_1 .



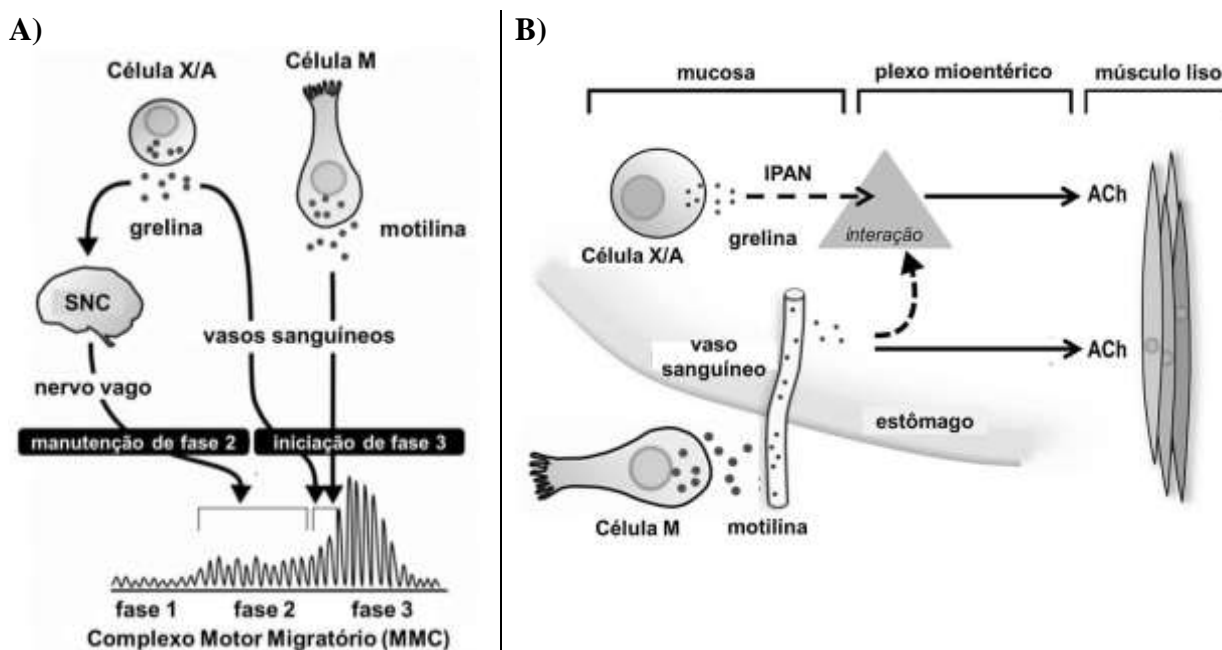
Legenda: β_1R : receptor beta-1 adrenérgico. cAMP: monofosfato cíclico de adenosina. PKA: proteína quinase A. IR: receptor de insulina. PI3K: fosfatidilinositol-3-quinase. AKT: proteína quinase B. GLUT 1/4/5: transportador tipo 1, 4 e 5 de glicose. **Fonte:** Adaptado de Dong e Brubaker (2012).

Além dos estímulos colinérgicos e adrenérgicos, tem sido reportado na literatura que a secreção de grelina também é favorecida pela vasopressina (IWAKURA et al., 2011), secretina (DE LA COUR; NORLÉN; HÅKANSON, 2007), endotelina 1 e 3 (THANTHAN et al., 2010), polipeptídeo gástrico inibitório (GIP) (ENGELSTOFT et al., 2013) oxitocina, dopamina e glucagon (GAGNON; ANINI, 2013).

Em adição ao seu efeito sobre a ingestão alimentar, a grelina é um potente estimulador do esvaziamento gástrico e da motilidade gastrointestinal, pois contribui com a iniciação das contrações gástricas de fase III do complexo motor migratório (MMC) (SANGER; FURNESS, 2016), mediada pelo nervo vago, conforme apresentado na **Figura 05-A**. De modo geral, o MMC, consiste em três fases: fase I de quiescência motora, fase II de contrações irregulares, e fase III de potentes contrações agrupadas (FUJITSUKA et al., 2012).

Além do cérebro, glândula pituitária, adrenais, tireoide, baço, pâncreas, tecido adiposo e miocárdio, os receptores de grelina também são expressos em neurônios mioentéricos gástricos (XU et al., 2005). Estes últimos sugerem a existência de um mecanismo de ativação direta do SNE, como mostrado na **Figura 5-B**, uma vez que, em ratos e camundongos, o efeito gastrocinético da grelina tem sido observado *in vitro* (MONDAL et al., 2013).

Figura 5 – Vias diretas e indiretas de contração do músculo liso gastrointestinal reguladas pela grelina e outros peptídeos sinalizadores, como a motilina.



Legenda: Em **A**: Regulação do MMC através de vias vagovagais. Em **B**: Ativação direta de componentes do SNE para contração do músculo liso gastrointestinal. X/A: células secretoras de grelina em ratos. M cell: células secretoras de motilina. MMC: complexo motor migratório. IPAN: neurônio aferente intrínseco primário. ACh: acetilcolina **Fonte:** Em **A**: Adaptado de Miyano et al. (2013). Em **B**: Adaptado de Mondal et al. (2013).

Além da grelina, concentrações hipotalâmicas aumentadas de serotonina, assim como a expressão de receptores 5-HT's, têm sido relacionados com o início da caquexia-anorexia associada ao câncer em modelos experimentais *in vivo* (MOLFINO et al., 2015). Neste sentido, os efeitos catabólicos característicos podem ser consequência do acúmulo cerebral de triptofano, precursor da serotonina, durante a síndrome da caquexia (LAVIANO et al., 2007).

A serotonina produzida no cérebro apresenta uma relação direta com a perda de peso corporal (OH; PARK; KIM, 2016), enquanto que as suas concentrações aumentadas, periféricamente, são associados com ganho de peso (KIM et al., 2011). A serotonina é um regulador importante da motilidade gastrointestinal, por sua ação em neurônios sensoriais intrínsecos e extrínsecos, e cerca de 95% é sintetizado pelas células enterocromafins (BERTRAND; BERTRAND, 2010).

1.7 Modulação de funções fisiológicas pelo sistema endocanabinoide

Além dos fatores elencados anteriormente, os efeitos estimulatórios sobre a secreção de grelina também tem sido observados com os canabinoides endógenos, a exemplo da anandamida, e sintéticos, como o CPP0540, os quais, conforme apontado em pesquisas, estimularam, por meio da ativação de receptores endocanabinoides (CBR's), a secreção de grelina (DAVIS, 2018; ZBUCKI et al., 2008).

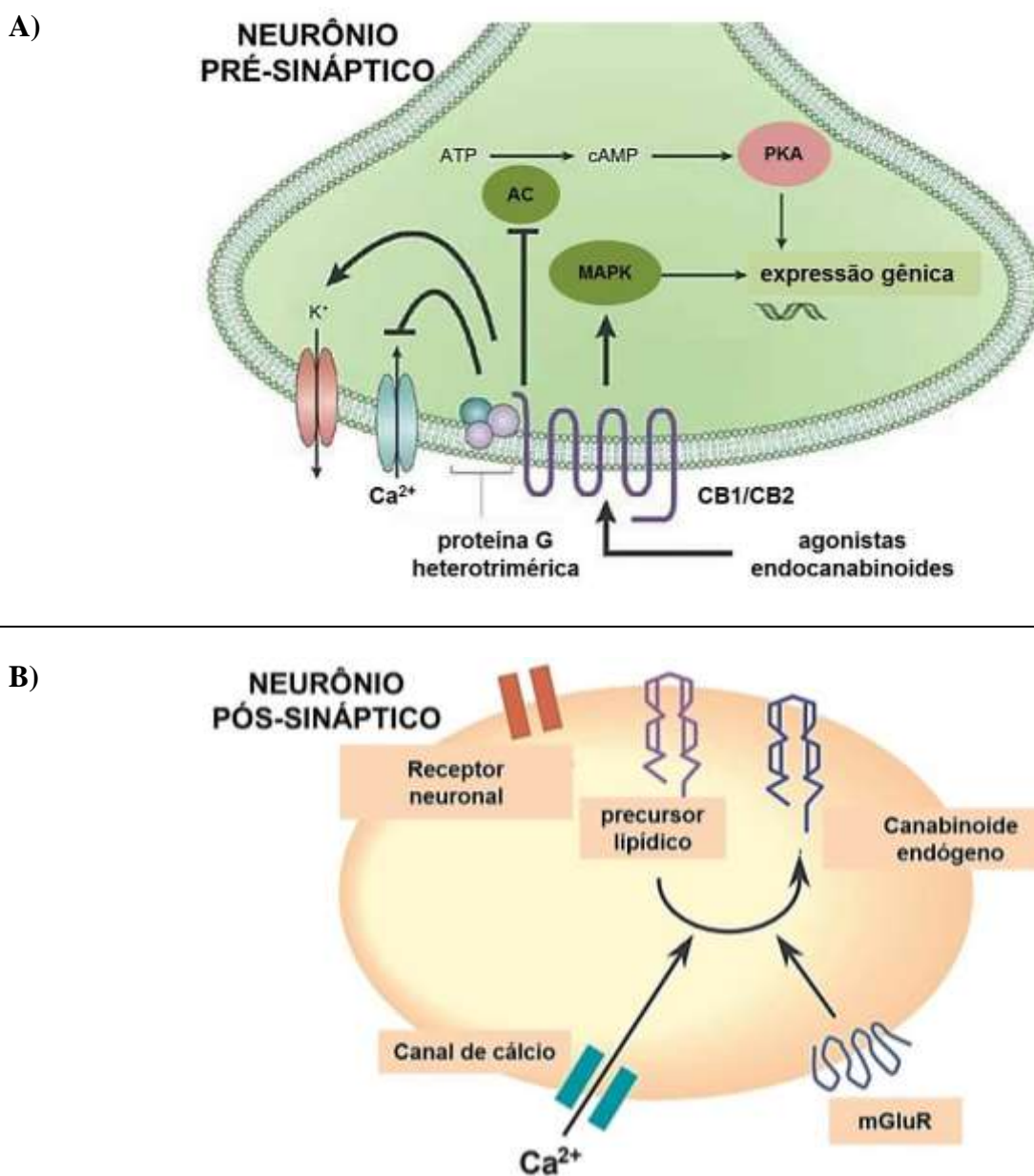
Estudos reportaram que o receptor CB1 pode formar heterodímeros com o receptor de grelina (SCHELLEKENS; DINAN; CRYAN, 2010). Em razão desta interação, pesquisas têm sugerido os efeitos potenciais dos canabinoides sobre o apetite e o peso corporal, nos casos de caquexia associada ao câncer (TURGEMAN; BAR-SELA, 2017).

Os canabinoides endógenos ou sintéticos estimulam receptores canabinoides tipo 1 (CB1), tipo 2 (CB2), e também atuam no receptor vaniloide de potencial transiente (TRPV) (MACCARRONE et al., 2015). Os receptores canabinoides do tipo CB1 são amplamente expressos nos neurônios, tais como os GABAérgicos, glutamatérgicos, serotoninérgicos, noradrenérgicos e dopaminérgicos (KATONA; FREUND, 2012), enquanto os receptores CB2 são primariamente localizados em células do sistema imune (ATWOOD; MACKIE, 2010).

Os receptores CB1 e CB2 são acoplados à proteína G (GPCR's), e parecem funcionar em vias fisiológicas únicas, apesar de serem expressos em distintos locais (WHYTE et al., 2010). Os receptores CB1 podem se acoplar às classes de proteínas Gs, Gi e Gq, as quais iniciam um conjunto único de mecanismos de sinalização (BRYANT et al., 2018).

Na visão clássica, a ativação de receptores CB1 e CB2 ocasiona uma inibição da enzima adenilil ciclase, mediada pela proteína Gi, com subsequente fechamento dos canais de Ca^{2+} e abertura dos canais de K^+ , o que pode justificar o modo retrógrado da sinalização endocanabinoide no SNC, o qual enuncia que neurônios pós-sinápticos ativados liberam endocanabinoides, que diminuem o Ca^{2+} intracelular e inibem a liberação de neurotransmissores de neurônios pré-sinápticos (HORN et al., 2018), como visto na **Figura 6**.

Figura 6 – Sinalização endocanabinoide em neurônios pré-sinápticos e pós-sinápticos.



Legenda: *ATP*: trifosfato de adenosina. *cAMP*: monofosfato cíclico de adenosina. *PKA*: proteína quinase A. *AC*: adenilil ciclase. *MAPK*: proteína quinase ativada por mitógeno. *CB1/CB2*: receptor canabinoide tipo 1 e tipo 2. *Ca²⁺*: íons cálcio. mGluR: receptor metabotrópico de glutamato. **Fonte:** Em **A**: Adaptado de Marzo, Bifulco e Petrocellis (2004). Em **B**: Adaptado de Wilson (2002).

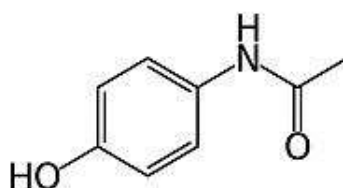
A ativação do receptor CB1 pode desencadear outros mecanismos intracelulares, tais como, ativação da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), proteína quinase relacionada a sinais extracelulares (ERK) e fosfatidilinositol-3 quinase (PI3K) (OWEN; SUTTER; ALBERTSON, 2014).

Os endocannabinoides estão fisiologicamente envolvidos na regulação da motilidade gastrintestinal, de modo que os músculos longitudinais e circulares são responsivos à ação inibitória dos agonistas canabinoides, que decorre principalmente da redução da liberação de acetilcolina de nervos pré-juncionais (IZZO; SHARKEY, 2010).

1.8 Avaliação do esvaziamento gástrico pelo acetaminofeno

O acetaminofeno, como mostrado na **Figura 7**, é um fármaco solúvel em água, e comumente utilizado como analgésico e antipirético (BURGSTALLER; WITTEK; SMITH, 2017). Também chamado de paracetamol, ambos os termos são derivados da nomenclatura química: n-acetil-para-aminofenol (JÓZWIAK-BEBENISTA; NOWAK, 2014). Este composto possui uma estrutura fenólica com um substituinte na posição “*para*” relativa ao grupamento hidroxil (SHERTZER et al., 2008).

Figura 7 – Estrutura química do acetaminofeno.



Fonte: Adaptado de Souri et al. (2015).

Além disso, é um exemplo clássico de substância com alta permeabilidade (LEVITT, 2013), e que possui uma absorção intestinal rápida, a qual ocorre instantaneamente conforme o processo de esvaziamento gástrico (NØHR et al., 2014). O acetaminofeno é um ácido fraco, com um pKa de 9,5, a 25 °C, o que faz com que, em meio ácido, esta substância sofra uma extensa ionização e, portanto, não seja absorvido ao nível do estômago (MARZUILLO; GUARINO; BARBI, 2014).

Dessa forma, o esvaziamento gástrico corresponde à etapa limitante que determina o aparecimento do fármaco na circulação, decorrente de sua rápida absorção no intestino delgado (HOLWERDA et al., 2016). Embora todo o trato gastrointestinal seja capaz de realizar a absorção de substâncias, o principal local onde este processo ocorre envolve a porção proximal do intestino delgado, correspondente ao duodeno (ELBADAWY et al., 2015). Quando administrado oralmente, a absorção do acetaminofeno na barreira do intestino delgado ocorre por difusão, através de vias paracelulares e transcelulares (LU et al., 1992).

Sob uma cinética farmacológica, as concentrações plasmáticas de acetaminofeno refletem o esvaziamento gástrico ao longo do tempo (MARTINEZ et al., 2017). Essas observações foram iniciadas por estudos pioneiros como o de Heading et al. (1973), no qual foi investigada a relação entre o tempo de metade do esvaziamento gástrico ($T_{1/2,GE}$), as concentrações máximas (C_{max}) e os respectivos tempos máximos (T_{max}), em humanos.

Geralmente, a taxa, na qual o conteúdo do estômago é esvaziado para o duodeno, controla a porcentagem pela qual os fármacos são absorvidos, como determinado pelos valores de tempo máximo (T_{max}) e concentração máxima (C_{max}) (JOHNSON et al., 2018). Tem sido reportado que os valores de T_{max} do acetaminofeno podem ser utilizados como marcadores do tempo de esvaziamento gástrico (AMEKYEYEH et al., 2015).

O pico das concentrações plasmáticas de acetaminofeno é tipicamente alcançado em 30 a 60 minutos, após a ingestão do mesmo, com um tempo de meia-vida de aproximadamente 2 horas (VAN CAN et al., 2014). Este fármaco possui biodisponibilidade de cerca 88% (HODGMAN; GARRARD, 2012), e um metabolismo hepático, que resulta em conjugados glicuronados (52-57%), e sulfatados (30-44%) (MARIN et al., 2018).

O tempo de esvaziamento gástrico total, em minutos, pode ser derivado da curva de concentração de acetaminofeno *vs.* tempo, de modo que o ponto de tempo, em que a concentração do fármaco no estômago é zero, indica a completa passagem para o duodeno e representa um esvaziamento completo do estômago (SALDEN et al., 2015).

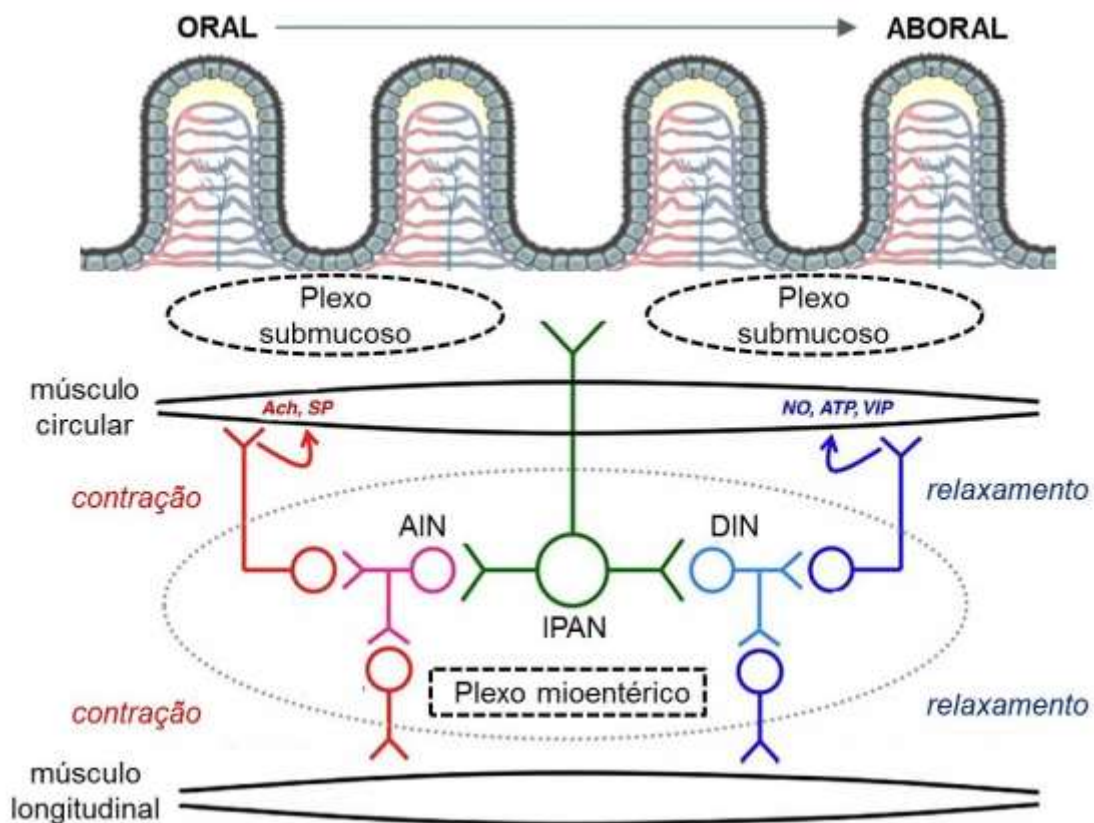
Neste sentido, o acetaminofeno pode ser usado como ferramenta para a investigação de alterações na motilidade gástrica ocasionadas, por exemplo, por substâncias que afetam o esvaziamento gástrico (SRINIVAS, 2015). Contudo, em pacientes criticamente doentes, o teste de absorção de acetaminofeno pode ser difícil de interpretar, por conta da necessidade do uso desse medicamento para propósitos clínicos, bem como de variações nos efeitos do metabolismo hepático de primeira passagem que tais indivíduos apresentam (CHAPMAN et al., 2016).

1.9 Efeitos da caquexia sobre componentes do sistema nervoso entérico

O sistema nervoso entérico origina-se da crista neural, a partir dos segmentos sacrais e vagais do tubo neural (LAKE; HEUCKEROTH, 2013), cujas células, na presença de estímulos intrínsecos e extracelulares, diferenciam-se em neurônios entéricos (ROY-CARSON et al., 2017). O SNE é constituído por cerca de 500 milhões de neurônios, mais do que o número de células neurais no sistema nervoso autônomo periférico (FURNESS, 2016).

O SNE consiste em dois plexos: o plexo nervoso mioentérico, situado entre as camadas musculares longitudinais e circulares, e o plexo submucoso, situado na camada submucosa profunda (OHLSSON, 2017). Todos os tipos de neurotransmissores no sistema nervoso central podem ser detectados no SNE, de forma que, enquanto, o plexo submucoso regula principalmente as funções secretoras e sensoriais do intestino, o plexo mioentérico regula a motilidade através de neurônios excitatórios e inibitórios (FURNESS et al., 2014), conforme apresentado na **Figura 8**.

Figura 8 – Arquitetura neuronal do sistema nervoso entérico e controle da motilidade.



Legenda: *ACh*: Acetilcolina. *SP*: Substância P. *AIN*: interneurônio ascendente. *IPAN*: neurônio aferente intrínseco primário. *NO*: óxido nítrico. *ATP*: trifosfato de adenosina. *VIP*: peptídeo intestinal vasoativo. *DIN*: interneurônio descendente. **Fonte:** Adaptado de Vera, Fichna e Abalo (2017).

No plexo mioentérico do intestino delgado, os neurônios colinérgicos constituem a maior subpopulação, dentre as células neuronais, e compreendem cerca de 75% do total (KURNIK et al., 2015). Outros componentes correspondem às células gliais entéricas, homólogas aos astrócitos do sistema nervoso central, que garantem suporte estrutural e funcional aos neurônios entéricos (NEUNLIST et al., 2014), e também estão envolvidas na motilidade gastrointestinal, neurotransmissão, funções imunes e manutenção da integridade da barreira epitelial intestinal (MCCLAIN et al., 2014).

As contrações do fundo e do antro do estômago juntamente com o relaxamento do esfíncter pilórico são coordenadas por músculo liso, nervos autonômicos e células intersticiais de Cajal (ICC), de forma que perdas nessa conexão resultam em uma série de mudanças histológicas (ANGELI et al., 2015). Nesse sentido, a restauração dos componentes do sistema nervoso entérico representa uma alternativa terapêutica para o tratamento de distúrbios da motilidade gastrointestinal (BURNS et al., 2016).

As células intersticiais de Cajal são tipos celulares que interagem com nervos entéricos para produzir sinais excitatórios e inibitórios, e que atuam na regulação da contratilidade do músculo liso através da progressão de ondas lentas que resultam em despolarização de canais de cálcio tipo L, de forma semelhante a um marca-passo (LIU; ABELL, 2017). No processo de contração do músculo liso e esvaziamento gástrico, como mostrado na **Figura 9**, um componente-chave envolve a fosforilação da cadeia leve de miosina por proteínas quinases (LEMBO et al., 2016).

Figura 9 – Interações das células intersticiais de Cajal e neurônios nitrérgicos com células de músculo liso do trato gastrointestinal.



Legenda: ICC: células intersticiais de Cajal. nNOS: óxido nítrico sintase neuronal. NO: óxido nítrico. GE: esvaziamento gástrico. **Fonte:** Adaptado de Liu e Abell (2017).

As ICC's são classificadas em subtipos de acordo com as suas localizações nas camadas tissulares do trato gastrointestinal, bem como suas características morfológicas e funcionais (GFROERER; ROLE, 2013). Estudos tem demonstrado que nas células de Cajal existem canais de potássio controlados por nucleotídeos cíclicos e ativados por hiperpolarização (HCN's), os quais são reguladores importantes da excitabilidade e da atividade de marca-passo dessas células (O'DONNELL; COYLE; PURI, 2015).

Essa família de canais HCN compreende 04 membros, designados HCN1-4, que são permeáveis ao Na^+ e K^+ (DI FRANCESCO; DI FRANCESCO, 2015). Esses canais ativam canais de Ca^{2+} tipo T, dependentes de voltagem, por meio de despolarizações de membrana, que altera as concentrações intracelulares de cálcio (BERNARD et al., 2014).

Em um estudo realizado com o modelo experimental de tumor de Walker 256 em ratos, os quais desenvolveram caquexia, observou se uma diminuição quantitativa de ICC's, porém acompanhada da preservação na rede estrutural dessas células decorrente de uma síntese proteica aumentada (FRACARO et al., 2016). Resultados de estudos prévios também destacaram que a manutenção da rede das células intersticiais e da função intestinal não foi resultante de aumento na proliferação das ICC's (KLEIN et al., 2013b).

Outro estudo desenvolvido com o modelo de caquexia, associada a tumor do tipo Walker 256, demonstrou uma redução em parâmetros como a densidade neuronal total, e subpopulações específicas de neurônios imunorreativos para a enzima colina-acetiltransferase (ChAT) e o peptídeo intestinal vasoativo (VIP), bem como uma atrofia somática subsequente, o que foi justificado pelos efeitos sistêmicos da caquexia mediados pelo estresse oxidativo (VICENTINI et al., 2016). Essas alterações neuronais também podem ser observadas em condições patológicas marcadas por injúria tecidual decorrente de estresse oxidativo (SOARES et al., 2015).

Conforme apresentado ao longo dos tópicos anteriores, a caquexia apresenta uma série de repercussões sistêmicas, assim como no trato gastrointestinal. Contudo poucos são os estudos voltados para a elucidação dos mecanismos envolvidos nas alterações em componentes reguladores da motilidade gástrica, associadas com as alterações fisiológicas decorrentes da caquexia, o que faz com o que o desenvolvimento desta pesquisa seja de grande importância científica.

Neste sentido, o presente estudo foi desenvolvido com o intuito de investigar o envolvimento vagal e de receptores β -adrenérgicos e canabinoides nas alterações gastrointestinais de ratos com caquexia induzida por células de Yoshida AH-130.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Investigar o envolvimento vagal e de receptores β -adrenérgicos e canabinoides nas alterações gastrintestinais de ratos com caquexia induzida por células de Yoshida AH-130.

2.2 Objetivos específicos

- Verificar possíveis alterações no consumo alimentar, peso corporal e índice de caquexia de ratos com caquexia induzida;
- Caracterizar o teste de absorção de acetaminofeno como ferramenta para estudo do processo de esvaziamento gástrico de ratos, com relação à sensibilidade, hepatotoxicidade, e viabilidade de coletas seriadas de sangue;
- Avaliar o esvaziamento gástrico *in vivo* e a responsividade, via contratilidade *in vitro*, de tiras isoladas de fundo gástrico e segmentos de duodeno de ratos com caquexia induzida;
- Quantificar as concentrações de citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF- α em fundo gástrico de ratos caquéticos;
- Estudar a participação de receptores β 1-adrenérgicos nas possíveis alterações de motilidade gástrica em ratos com caquexia;
- Caracterizar a participação parassimpática, via nervo vago, sobre alterações de motilidade gástrica em ratos com caquexia;
- Investigar o papel da via endocanabinoide sobre as alterações de motilidade gástrica em ratos com caquexia.

Material e Métodos

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais experimentais

Foram utilizados ratos machos albinos, da espécie *Rattus norvegicus*, linhagem Wistar, com peso de 280 ± 10 g, e 8 semanas de idade, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Agrárias (CCA), da Universidade Federal do Piauí (UFPI).

Em modelos animais de caquexia induzida, o gênero sexual é um fator crítico para a interpretação correta dos resultados experimentais e, nesse sentido, observações de estudos demonstraram que os machos, em relação às fêmeas, são mais adversamente afetados pela caquexia, especialmente no que se refere à perda de peso, massa e força muscular (MICHAELIS et al., 2017), os quais são parâmetros determinantes para a sobrevida de pacientes com câncer (DI SEBASTIANO et al., 2013).

Como reportado por um estudo de meta-análise, os animais do sexo feminino não apresentam variações excessivas nos traços fisiológicos, em comparação àqueles do sexo masculino (PRENDERGAST; ONISH; ZUCKER, 2014), no entanto devem ser consideradas as flutuações hormonais associadas com o ciclo reprodutivo das fêmeas (BECKER; PRENDERGAST; LIANG, 2016). Portanto, contabilizar o sexo do animal experimental como uma variável nas pesquisas biomédicas é um fator considerado fundamental para o aumento do rigor e da reprodutibilidade da pesquisa pré-clínica (CLAYTON, 2016).

Todos os animais, portanto, foram mantidos em gaiolas grandes, modelo padrão, com dimensões totais de $30 \times 50 \times 25$ cm³, devidamente identificadas, por um período de adaptação de 1 semana, sob condições controladas de temperatura, equivalente a 25 ± 1 °C, e umidade 50-55%, com livre acesso a ração tipo pellets (Purina®) e água filtrada, mantidos em ciclo claro/escuro de 12 horas, com a fase clara de 6:00 horas às 18:00 horas.

3.2 Aspectos éticos e legais da pesquisa

Todos os protocolos experimentais elencados e descritos adiante foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Universidade Federal do Piauí (UFPI), mediante emissão de certificado de nº 432/18 (**Anexo B**). Ademais, os métodos foram executados de acordo com as determinações previstas na Lei de Uso e Experimentação Animal nº 11.794, de 8 de outubro de 2008.

3.3 Modelo experimental de caquexia induzida por células de yoshida AH-130

Neste estudo, realizou-se a indução de caquexia por meio da inoculação intraperitoneal de células tumorais de Yoshida AH-130, pois este é um modelo bem descrito de caquexia associada ao câncer, no qual é possível observar um atrofia muscular esquelética nos ratos, bem como uma grande ativação de vias proteolíticas (MASTROCOLA et al., 2008), o que resulta em uma perda de peso corporal evidente (BONETTO et al., 2009).

3.3.1 Melhoria da viabilidade das células de Yoshida AH-130

Os frascos criogênicos que continham as células foram cuidadosamente retirados do recipiente com nitrogênio. Estes foram expostos aos ambientes com uma variação gradativa de temperatura (freezer, geladeira, e temperatura ambiente), a fim de promover a passagem do conteúdo celular, do estado sólido congelado para o estado líquido, com a garantia da preservação das células contra um possível choque térmico, durante o descongelamento.

As células, já no estado líquido, foram inoculadas em 2 ratos, previamente escolhidos. Com uma seringa, desprovida de agulha, foram coletados 2 mL do conteúdo líquido no interior dos frascos. Logo após, uma agulha foi acoplada à seringa, e o volume coletado foi administrado em cada rato, por via intraperitoneal, o qual, após o término da injeção, foi colocado nas suas respectivas gaiolas, identificadas e equipadas com água filtrada e ração.

Após 7 dias, com o crescimento do tumor comprovado pelo aumento no volume abdominal, cada rato portador das células inoculadas foi anestesiado com a administração da solução única do anestésico geral, cetamina e xilazina, na dose de 100 mg/kg e 5 mg/kg, por via intramuscular, respectivamente. Com o efeito da substância anestésica, punccionou-se a região abdominal lateral para a coleta de 2 mL do volume formado.

A seringa com o volume foi desacoplada da agulha, e esta permaneceu punccionada no rato, com o intuito de “tamponar” a punção realizada, evitar o extravasamento do líquido formado, bem como impedir a entrada de agentes biológicos dispersos no ambiente, os quais poderiam promover infecções no animal e comprometer a viabilidade das células em processo de coleta, que são essenciais para o estabelecimento do modelo experimental de caquexia.

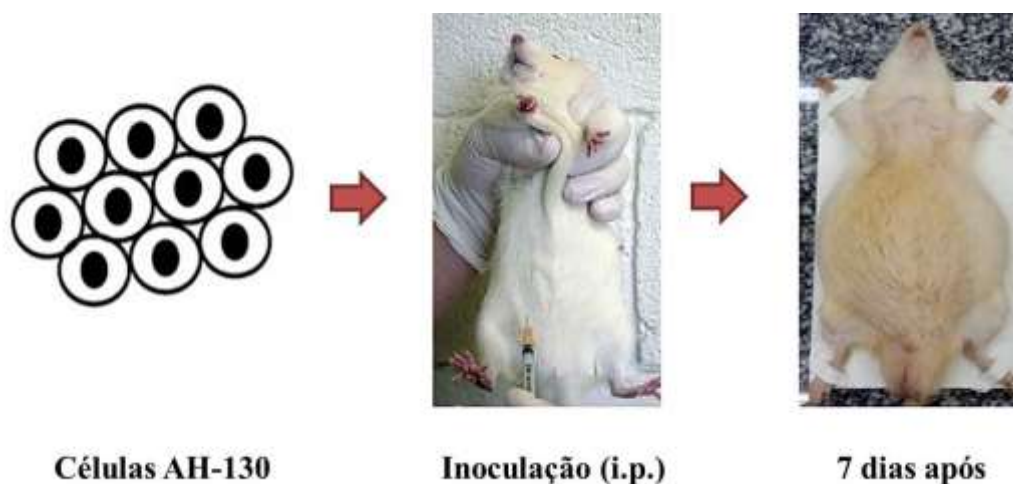
Para receber as células foram utilizados dois ratos previamente selecionados. Foi acoplada uma nova agulha à seringa e o conteúdo coletado foi administrado, por via intraperitoneal, ao rato selecionado, o qual foi, em seguida, colocado nas gaiolas, devidamente identificadas e providas de água filtrada e ração. O mesmo foi realizado para o segundo rato.

Ao término da inoculação das células AH-130, os ratos, sobre os quais foi coletado o líquido tumoral, foram sacrificados com a administração de lidocaína, a 10 mg/kg, por via intraperitoneal, e tiopental sódico, a uma dose letal de 150 mg/kg de peso corporal, por via intraperitoneal. Em seguida foi feita uma pequena incisão abdominal, e o volume restante foi coletado em um béquer para o descarte adequado.

Os animais sacrificados, dos quais o líquido abdominal foi coletado, foram acondicionados adequadamente em sacos plásticos, devidamente identificados, e encaminhados ao equipamento de refrigeração para animais, segundo as determinações de biossegurança. Após um período de 7 dias, o mesmo procedimento descrito foi repetido, até um total de 5 inoculações sucessivas, durante 5 semanas.

Este procedimento, conforme apresentado na **Figura 10**, foi realizado com o intuito de aumentar a viabilidade das células tumorais AH-130, e mantê-las disponíveis para uso, tal como recomendado no estudo de Cinosi (2011), no qual foram feitas as referidas inoculações semanais consecutivas. Após as 5 semanas, realizou-se a indução de caquexia.

Figura 10 – Procedimento para melhora da viabilidade das células tumorais AH-130



Legenda: *i.p.*: intraperitoneal. **Fonte:** Própria.

3.3.2 Indução de caquexia através de inoculação das células tumorais viáveis

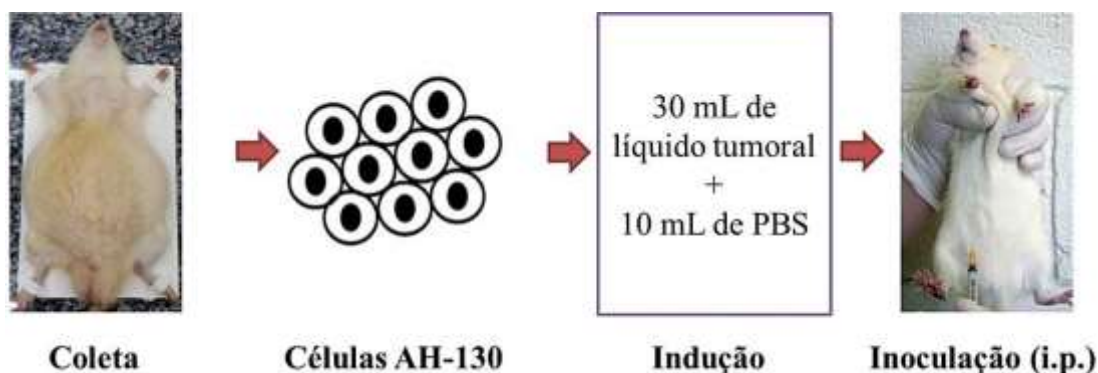
A indução de caquexia foi realizada, de forma adaptada, conforme Ohbuchi et al. (2015). Após a etapa de melhora da viabilidade das células AH-130, foram selecionados ratos portadores, com células tumorais viáveis, para a indução de caquexia. Inicialmente, foram colocados 10 mL de tampão salina fosfato (PBS) em um béquer de vidro, o qual foi incubado em banho-maria, na temperatura de $35^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$.

Em cada animal portador das células tumorais AH-130 foi administrada a solução única do anestésico geral, cetamina e xilazina, na dose de 100 mg/kg e 5 mg/kg, por via intramuscular, respectivamente. Logo em seguida, com uma agulha acoplada em uma seringa, a região abdominal lateral foi puncionada para a coleta de 10 mL do volume formado. A seringa com o volume foi desacoplada da agulha, e esta permaneceu puncionada no rato. O conteúdo coletado foi colocado cuidadosamente no béquer incubado no banho-maria. Esse procedimento foi repetido 3 vezes para a coleta de 30 mL do líquido abdominal.

Em seguida, com uma seringa desprovida de agulha, foram coletados 2 mL da solução final presente no béquer. Uma agulha foi acoplada à seringa com o volume coletado e o conteúdo foi inoculado em cada animal dos grupos experimentais, por via intraperitoneal, o qual, logo após, foi colocado nas respectivas gaiolas, munidas de ração e água filtrada.

Segundo Toledo et al. (2016), o volume, obtido de um animal portador de um tumor abdominal em crescimento exponencial, permite a inoculação de um total de 10^8 células de Yoshida necessárias para a indução de caquexia, conforme apresentado na **Figura 11**. Todas as induções foram realizadas no final da manhã e início do período vespertino. Os ratos do grupo “Controle” foram administrados com solução salina (0,9%), em um volume de 0,1mL/100g de peso corporal (i.p.), e acondicionados em gaiolas, com ração e água filtrada.

Figura 11 – Modelo experimental de indução de caquexia.



Legenda: *i.p.*: intraperitoneal. **Fonte:** Própria.

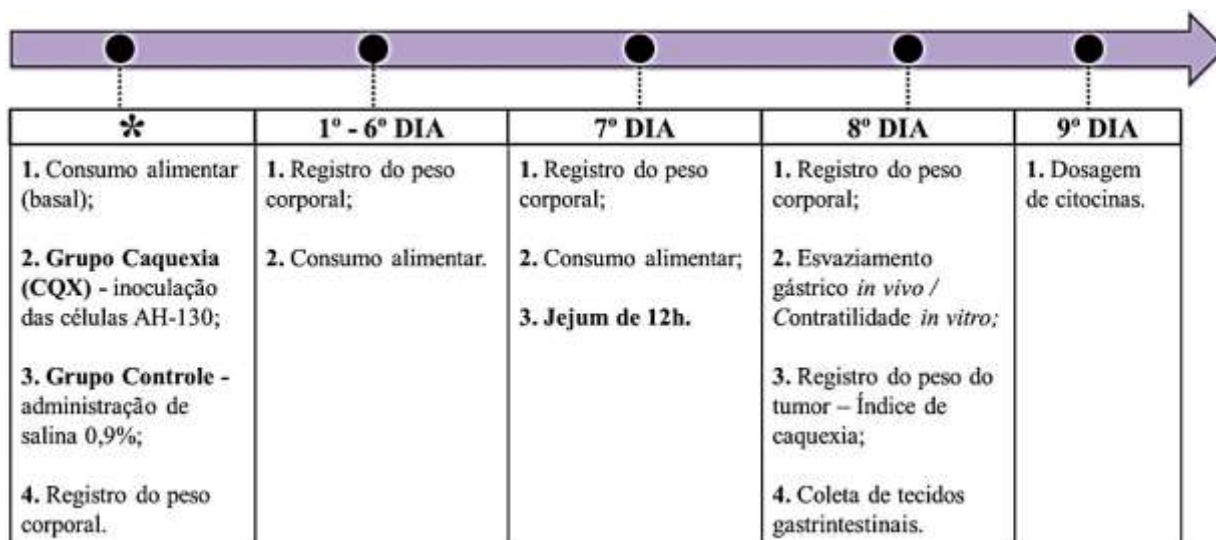
Ao fim da indução, os ratos já anestesiados, dos quais coletou-se o volume abdominal, foram sacrificados com a administração de lidocaína, 10 mg/kg (i.p.), e do anestésico tiopental sódico, a uma dose letal de 150 mg/kg de peso (i.p.). Logo após, foi realizada uma incisão abdominal, e o conteúdo líquido foi coletado em um béquer para o descarte adequado. Os ratos sacrificados foram acondicionados em sacos plásticos, identificados, e encaminhados ao equipamento de refrigeração, conforme determinações de biossegurança.

3.4 Delineamento e abordagens experimentais

3.4.1 Investigação de alterações fisiológicas e gastrintestinais de ratos com caquexia induzida por células AH-130

A **Figura 12** mostra o delineamento dos experimentos realizados para a caracterização dos grupos “Controle” e “Caquexia” quanto ao peso corporal, consumo alimentar, índice de caquexia, esvaziamento gástrico *in vivo*, contratilidade *in vitro*, e dosagem de citocinas em fundo gástrico de ratos com caquexia.

Figura 12 – Delineamento experimental para os grupos “Controle” e “Caquexia”.



Legenda: O asterisco (*) representa o dia em que foi realizada a indução de caquexia. **Fonte:** Própria.

Após a indução de caquexia, determinou-se um período fixo de 7 dias, necessários para o desenvolvimento da doença, conforme recomendado no estudo de Salazar-Degracia et al. (2017), de modo que no 8º dia, com os animais em jejum, foram realizados os protocolos elencados na figura acima, tal como realizado no estudo de Fontes-Oliveira et al. (2013).

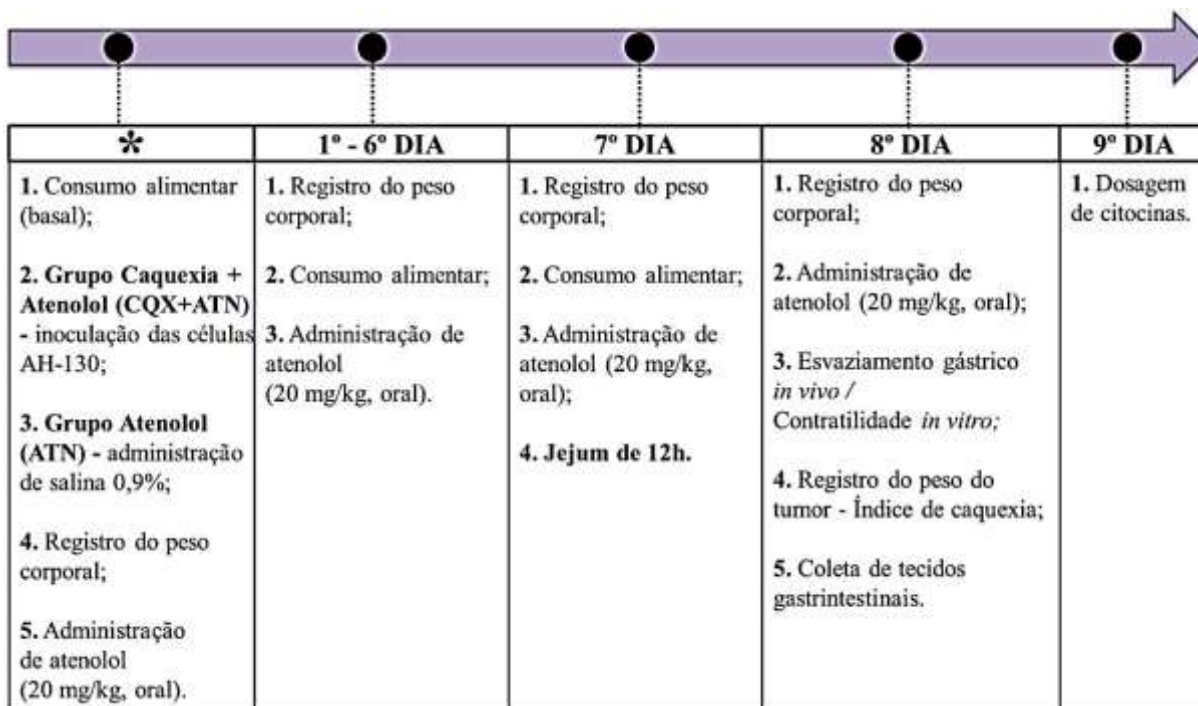
3.4.2 Investigação da participação de receptores β 1-adrenérgicos sobre alterações fisiológicas e gástricas de ratos com caquexia induzida

Estudos na literatura ressaltam a presença de concentrações plasmáticas elevadas de grelina na caquexia, durante o estado de jejum (SOLOMOU; KORBONITS, 2014). Portanto, decidiu-se investigar a possível participação deste componente sobre as alterações fisiológicas e gástricas de ratos com caquexia induzida por células de Yoshida AH-130, através da administração farmacológica de atenolol, um antagonista β 1-adrenérgico, denominado 4-(2-hidroxi-3-isopropilamino propoxi) fenilacetamida (EL-ALFY et al., 2019).

3.4.2.1 Administração de atenolol

O fármaco atenolol, obtido sob a forma de pó, foi pesado diariamente, 1h antes da administração, com o auxílio de uma balança analítica. Após a pesagem, o pó foi dissolvido em água destilada, para a obtenção de uma solução na concentração de 2 mg/mL. Esta foi administrada por via oral, na dose de 20 mg/kg (MANI et al., 2016), em um volume de 1mL/100g de peso corporal de cada animal. O desenho experimental encontra-se apresentado na **Figura 13**.

Figura 13 – Delineamento experimental para o grupo “Atenolol” e “Caquexia + Atenolol”.



Legenda: O asterisco (*) representa o dia em que foi realizada a indução de caquexia. **Fonte:** Própria.

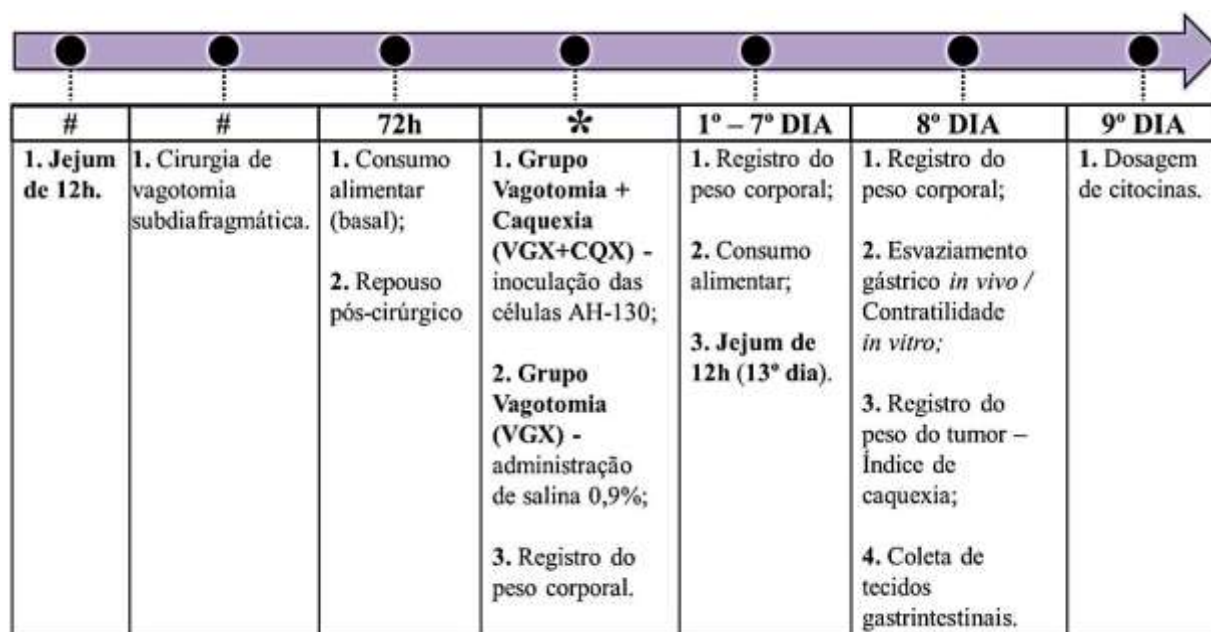
Todas as administrações foram realizadas diariamente, no final da manhã e início do período vespertino, a fim de manter concordância com o horário definido para as induções de caquexia (descrito na seção 3.3.2). Estas iniciaram-se no dia da indução de caquexia, durante os 7 dias após a indução, e no dia da realização dos protocolos experimentais. A última administração foi realizada 1h antes do início do protocolo.

3.4.3 Investigação do envolvimento parassimpático via nervo vago sobre alterações fisiológicas e gástricas de ratos com caquexia induzida

Em prosseguimento, decidiu-se investigar a possível participação de componentes neurais, como as vias vagais, sobre alterações fisiológicas e gástricas de ratos com caquexia induzida por células AH-130, visto que em condições normais, os estímulos promovidos pela grelina sobre o peso corporal (KHATIB et al., 2018b) e consumo alimentar (ALI; CHEN; GARCIA, 2013) convergem nas vias vagais aferentes (SAKATA et al., 2003).

A **Figura 14** mostra o desenho experimental utilizado para a avaliação da participação do nervo vago sobre o peso corporal, índice de caquexia, consumo alimentar, esvaziamento gástrico *in vivo*, contratilidade *in vitro*, e dosagem de citocinas em fundo gástrico de ratos com caquexia.

Figura 14 – Desenho experimental para o grupo “Vagotomia” e “Vagotomia + Caquexia”.



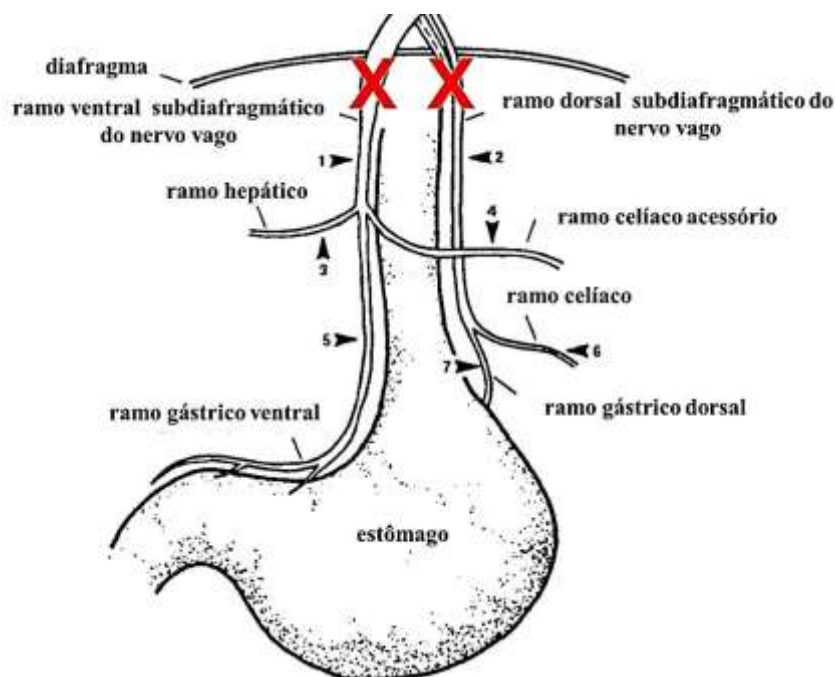
Legenda: A chave (#) representa o período pré-cirúrgico e cirúrgico. O asterisco (*) representa o dia em que foi realizada a indução de caquexia. **Fonte:** Própria.

3.4.3.1 Protocolo cirúrgico de vagotomia troncular subdiafragmática.

O procedimento cirúrgico de vagotomia troncular subdiafragmática foi realizado, de forma adaptada, conforme Mordes, Herrera e Silen (1977). Os animais foram colocados em gaiolas metabólicas, para jejum noturno por um período de 12 horas, com início às 18:00 horas.

No dia seguinte, após as 12 horas, foi administrada a solução única do anestésico geral, cetamina e xilazina (100 mg/kg e 5 mg/kg, por via intramuscular). O procedimento cirúrgico, conforme representado na **Figura 15**, foi iniciado com o efeito da anestesia, evidenciado pela perda da estabilidade postural e sensorial do animal experimental.

Figura 15 – Representação anatômica do procedimento de vagotomia subdiafragmática



Legenda: X: pontos de secção do nervo vago na região subdiafragmática. 1 – ramificação vagal ventral. 2 – ramificação vagal dorsal. 3 – ramificação hepática. 4 – ramificação celíaca acessória. 5 – ramificação gástrica ventral. 6 – ramificação celíaca. 7 – ramificação gástrica dorsal. **Fonte:** Adaptado de Dixon et al. (2000).

Cada animal foi submetido a uma laparotomia mediana, com o auxílio de uma tesoura cirúrgica, para a exposição do esôfago abdominal. Com lentes binoculares de aumento, identificou-se o nervo vago, na região subdiafragmática do esôfago, 1,0 a 1,5 cm acima do esfíncter cárdico, o qual foi separado dos anexos tissulares com o uso de pinças. A vagotomia troncular subdiafragmática foi executada através da secção do nervo vago, na região citada anteriormente, e posterior instilação com 1 mL de álcool 70%. O procedimento de vagotomia foi confirmado visualmente por meio de uma inspeção com lente de aumento (10x).

Ao final do procedimento, a camada muscular da região cirúrgica foi adequadamente suturada, através do ponteio consecutivo, com fios de sutura de polipropileno, acoplados em um clipe de aço estéril. Em seguida, foi feito o ponteio da pele, de forma semelhante. Após o fechamento das incisões, toda a sujidade da região foi removida com um algodão embebido com 1 mL de solução salina estéril. Ao término, foi administrado o fármaco pentabiótico, na dose de 200 mg/kg, por via subcutânea, para evitar infecções bacterianas no pós-operatório.

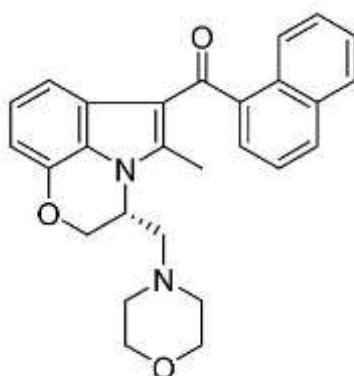
Cada animal foi colocado em gaiola individual, com ração e água. Após 72 horas da realização da vagotomia subdiafragmática, com a cicatrização da incisão cirúrgica, cada rato foi submetido ao protocolo de indução de caquexia, conforme descrito na seção 3.3.2, ou ao tratamento com solução salina (0,9%), em um volume de 0,1mL/100g (i.p.).

3.4.4 Investigação do papel das vias endocanabinoides sobre alterações fisiológicas e gástricas de ratos com caquexia induzida

Em continuidade, decidiu-se averiguar, o possível papel das vias endocanabinoides sobre alterações fisiológicas e gástricas de ratos com caquexia induzida por células AH-130, pois o sistema canabinoide é um potente modulador do comportamento alimentar (ORIO et al., 2011) e da motilidade gástrica, em condições fisiológicas e fisiopatológicas (IZZO; SHARKEY, 2010).

A investigação do papel das vias endocanabinoides foi realizada por meio da administração de win 55,212-2, um agonista de receptores CB1 e CB2 (ABALO et al., 2011), cuja estrutura química encontra-se apresentada na **Figura 16**. Optou-se pela administração diária, pois o efeito desta abordagem, com canabinoides, tem sido pouco estudado em roedores (URANGA; VERA; ABALO, 2018).

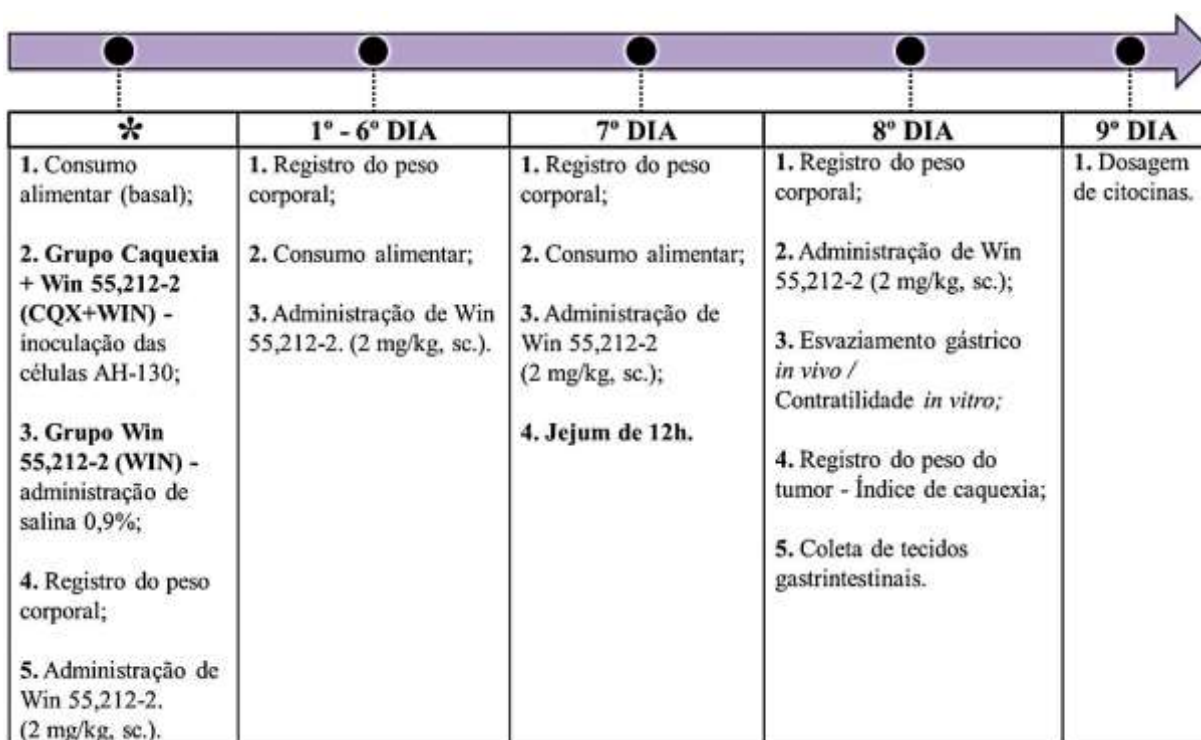
Figura 16 – Estrutura química do win 55,212-2.



3.4.4.1 Administração de win 55,212-2

Inicialmente reparou-se uma solução-estoque do win 55,212-2, o qual foi pesado em uma balança analítica e dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO), para a obtenção de uma solução na concentração de 2 mg/mL. A solução foi administrada na dose de 2 mg/kg (ABALO et al., 2010), em um volume de 100 μ L/100g de peso corporal, por via subcutânea, tal como apresentado no delineamento experimental na **Figura 17**.

Figura 17 – Delineamento experimental para o grupo “Win” e “Caquexia + Win”.



Legenda: O asterisco (*) representa o dia em que foi realizada a indução de caquexia. **Fonte:** Própria.

A via de administração exerce um efeito significativo na farmacocinética, biodisponibilidade e efetividade dos canabinoides (YASMIN-KARIM et al., 2018). Portanto, optou-se pela via subcutânea, em detrimento da intraperitoneal, pois o rato com caquexia é portador de um tumor líquido abdominal, que poderia, em hipótese, ocasionar interferências na cinética e dinâmica da substância. No estudo de Pin et al. (2017) e Moore-Carrasco et al. (2009), também foram administradas substâncias por via subcutânea, em ratos com caquexia induzida por células AH-130.

O win 55,212-2 foi administrado no final da manhã e início do período vespertino, para manter concordância com o horário definido para as induções de caquexia. Foram feitas administrações no dia da indução de caquexia, nos 7 dias seguintes, e 1h antes dos protocolos.

3.5 Protocolos experimentais

3.5.1 Análise do perfil de consumo alimentar

O consumo alimentar foi realizado, de forma adaptada, conforme Sun et al. (2016), antes (denominado Consumo basal) e após a indução de caquexia (durante 7 dias), no final da manhã e início do período vespertino, afim de manter concordância com o horário definido para as induções de caquexia, conforme descrito anteriormente na seção 3.3.2.

Inicialmente, cada animal foi alojado em uma gaiola individual, e foram ofertados 80g de ração tipo pellets (Purina®), juntamente com água filtrada, ambos para acesso *ad libitum*. A ração foi pesada com o auxílio de uma balança semi-analítica, e o peso final de 80 g foi ajustado com um bisturi, para o corte fino das bolas de ração.

No dia seguinte realizou-se a pesagem de toda a sobra de ração presente na gaiola, a qual foi trocada por um novo *pool* de bolas de ração, ofertado no peso de 80 g. De acordo com as fórmulas I e II, presentes no **Quadro 1**, foi determinado tanto o consumo alimentar diário, quanto a variação (Δ) de consumo alimentar, e ambos foram expressos em **gramas (g)**.

Quadro 1 – Fórmulas utilizadas para a determinação do consumo alimentar.	
I	$CA_{diário} = oferta\ de\ ração - sobra\ de\ ração$
II	$\Delta CA = ca_{final} - ca_{basal}$

Legenda: $CA_{diário}$: consumo alimentar diário. ΔCA : variação de consumo alimentar. ca_{final} : consumo alimentar no 7º dia após a indução de caquexia. ca_{basal} : consumo alimentar basal. **Fonte:** Própria.

3.5.2 Avaliação da variação de peso corporal

O peso corporal dos animais foi determinado, com o uso de uma balança digital, no dia da indução de caquexia ou tratamento com solução salina (0,9%), denominado de peso corporal inicial, e no 8º dia após a indução de caquexia, após a retirada do líquido tumoral, denominado de peso corporal final (sem tumor). Dessa forma, a variação de peso corporal foi determinada pela diferença entre o peso corporal final (sem tumor) e o peso corporal inicial.

Para a retirada do líquido tumoral procedeu-se com a administração de lidocaína, na dose de 10 mg/kg, por via intraperitoneal, e do anestésico tiopental sódico, a uma dose letal de 150 mg/kg de peso, por via intraperitoneal. Realizou-se uma pequena incisão na região abdominal, por meio da qual o líquido tumoral foi retirado e colocado em um béquer, e registrou-se o peso do animal, em **gramas (g)**, conforme apresentado na **Figura 18**.

Figura 18 – Procedimento para a retirada do líquido tumoral e pesagem dos animais



Fonte: Própria.

Em alguns casos, a perda de peso não necessariamente reflete a severidade da caquexia associada ao câncer, durante os estágios de progressão tumoral (ENGELN; VAN DER MEIJ; DEUTZ, 2016), o que faz com que parâmetros, como o índice de caquexia, tenham uma maior especificidade (TROMBINI et al., 2015). Portanto, no presente estudo, a aferição do peso corporal foi determinada conjuntamente com o Índice de caquexia (IC%), descrito no tópico a seguir.

3.5.3 Determinação do Índice de caquexia (IC%)

O líquido tumoral, colocado no béquer, foi devidamente pesado, e, juntamente com os pesos corporais iniciais e finais, com e sem o tumor, foi utilizado para o cálculo do índice de caquexia (IC), o qual foi expresso em **porcentagem %**. O índice de caquexia foi determinado de acordo com a fórmula apresentada no **Quadro 2**, de modo que foram considerados caquéticos, os animais experimentais que apresentaram um índice de caquexia maior que 10% (GUARNIER et al., 2010).

Quadro 2 – Fórmula empregada para o cálculo do índice de caquexia (IC).

$$\text{Índice de caquexia (\%)} = \left[\frac{pc1 - pc2 + pt + \Delta p_{controle}}{pc1 + \Delta p_{controle}} \right] \times 100\%$$

Legenda: *pc1*: peso corporal inicial. *pc2*: peso corporal final sem tumor. *pt*: peso do tumor. $\Delta p_{controle}$: ganho de peso dos animais do grupo Controle. **Fonte:** Adaptado de Martins et al. (2017).

3.5.4 Validação do teste de absorção de acetaminofeno como método de estudo do esvaziamento gástrico

No presente estudo, utilizou-se o teste de absorção de acetaminofeno, para avaliação do processo de esvaziamento gástrico de ratos, descrito no subtópico 3.5.5. Contudo, o mesmo foi previamente submetido às etapas de validação, quanto à sensibilidade, hepatotoxicidade e viabilidade de coletas seriadas de sangue.

3.5.4.1 *Investigação do efeito de variações volumétricas nas amostras-testes sobre a sensibilidade do teste de absorção de acetaminofeno.*

Usualmente o teste de absorção de acetaminofeno é realizado com um volume total de 200 μ L de soro. Portanto, investigou-se a sensibilidade do teste mediante o emprego de amostras de soro nos volumes de: 125 μ L, 100 μ L, 75 μ L, 50 μ L e 25 μ L. Os ratos foram postos em gaiolas metabólicas, para jejum noturno, por 12 horas, com início às 18:00 horas.

No dia seguinte, preparou-se a solução teste de acetaminofeno na concentração final de 10 mg/mL, a qual foi administrada na dose de 100 mg/kg (MARD et al., 2016), em um volume de 1mL/100g de peso. Imediatamente após, cada rato foi anestesiado com a solução do anestésico, cetamina e xilazina, na dose de 100 mg/kg e 5 mg/kg, por via intramuscular.

Acionou-se um cronômetro, e aos 10 minutos realizou-se a coleta de sangue da região do plexo retro-orbital. Para garantir a não justaposição dos tempos destinados à coleta de sangue, determinou-se um intervalo de 5 minutos entre as administrações. O procedimento de coleta de sangue foi realizado, de forma adaptada, segundo Fernández et al. (2010), no qual foram utilizados capilares de vidro divididos em três partes iguais. As extremidades foram polidas para remoção de resquícios pontiagudos, para evitar danos oculares severos ao animal.

O capilar foi introduzido cuidadosamente no canto da cavidade ocular, para a coleta de aproximadamente 700 μ L de sangue, em microtubos sem anticoagulante, que permaneceram em repouso por 30 minutos, para a retração do coágulo. Logo após, foram acoplados em uma centrífuga, programada para um perfil de rotação de 1.500 rcf por 12 minutos.

Ao fim das centrifugações, o soro foi separado, com uma micropipeta, e colocado em outros microtubos identificados. De cada rato, foram utilizados os volumes: 200 μ L, 125 μ L, 100 μ L, 75 μ L, 50 μ L e 25 μ L de soro para a determinação das concentrações de acetaminofeno. Em cada caso, o volume dos reagentes foi ajustado proporcionalmente (Ex.: 3mL do Reagente de cor para 200 μ L de soro; 1,5mL do Reagente de cor para 100 μ L de soro).

3.5.4.2 *Investigação do efeito da administração da solução teste de acetaminofeno sobre os marcadores bioquímicos de função hepática de ratos*

A análise de possíveis interferências da dose de acetaminofeno sobre a função hepática foi realizada por meio da dosagem das concentrações séricas de aminotransferases (TGO/AST e TGP/ALT) e albumina. Inicialmente, ratos normais foram colocados em gaiolas metabólicas, para jejum noturno por um período de 12 horas, com início às 18:00 horas.

No dia seguinte, os animais foram divididos em dois grupos: o primeiro foi tratado com veículo (água destilada), e o segundo com a solução teste de acetaminofeno, preparada na concentração de 10 mg/mL, e administrada na dose de 100 mg/kg (MARD et al., 2016), em um volume de 1mL/100g de peso corporal. Imediatamente após, cada rato foi anestesiado com a solução única do anestésico, cetamina e xilazina, na dose de 100 mg/kg e 5 mg/kg, por via intramuscular.

Acionou-se um cronômetro para a contagem do tempo, e aos 30 minutos realizou-se a coleta de amostra de sangue da região do plexo retro-orbital. Para garantir a não justaposição dos tempos destinados à coleta de sangue, determinou-se um intervalo de 10 minutos entre a administração da solução de acetaminofeno a um animal e outro.

O procedimento de coleta de amostras de sangue foi realizado, de forma adaptada, com base em Fernández et al. (2010), no qual foram utilizados capilares de vidro. Cada capilar foi dividido em três partes iguais, e as extremidades obtidas foram polidas para a remoção de resquílios pontiagudos, a fim de evitar danos oculares severos ao animal.

O capilar foi introduzido cuidadosamente no canto da cavidade ocular, na região do plexo retro-orbital, para a obtenção de aproximadamente 700 μ L de sangue. O sangue coletado foi acondicionado em microtubos, sem anticoagulantes, e previamente identificados. Todos os microtubos com o sangue coletado permaneceram em repouso por um tempo de 30 minutos, necessário para a retração do coágulo.

Após esse tempo, os mesmos foram acoplados em uma centrífuga, programada para um perfil de rotação de 1.500 rcf por 12 minutos. Ao fim das centrifugações, com o auxílio de uma micropipeta, o soro obtido foi separado do coágulo e colocado em outros microtubos plásticos com a mesma identificação. O soro foi então utilizado para a dosagem das concentrações de aminotransferases e albumina, as quais foram determinadas com o uso de kits bioquímicos comerciais.

3.5.4.3 Investigação do efeito de modificações negativas prévias da volemia sobre o esvaziamento gástrico de ratos normais

O protocolo de esvaziamento gástrico com acetaminofeno, descrito na seção 3.5.5, foi realizado mediante a coleta de amostras com aproximadamente 700 μ L de sangue do plexo retro-orbital dos ratos, em um total de seis pontos de tempo. Desse modo, decidiu-se investigar se as sucessivas coletas de sangue poderiam ocasionar alterações no esvaziamento gástrico.

De início, os animais experimentais foram colocados em gaiolas metabólicas, para jejum noturno por um período de 12 horas, com início às 18:00 horas. No dia seguinte, os mesmos foram divididos em dois grupos. Naqueles do primeiro grupo não foi feita qualquer retirada prévia de sangue.

Aqueles do segundo grupo foram submetidos à alteração da volemia, com uma coleta prévia de 4 mL de sangue, da região do plexo retro-orbital, com base em Fernández et al. (2010). Este valor corresponde ao volume aproximadamente coletado, para cada animal, ao final das seis coletas de sangue, na etapa pré-analítica do protocolo de esvaziamento gástrico ($6 \times 700 \mu\text{L}$ ou $0,7 \text{ mL} = 4,2 \text{ mL}$).

Em seguida, cada animal foi administrado com a solução teste de acetaminofeno, preparada na concentração de 10 mg/mL, e administrada na dose de 100 mg/kg (MARD et al., 2016), em um volume de 1mL/100g de peso corporal, e imediatamente anestesiado com a administração, por via intramuscular, da solução única do anestésico geral, cetamina e xilazina, na dose de 100 mg/kg e 5 mg/kg.

Um cronômetro foi acionado, e ao tempo de 10 minutos, foi coletada uma amostra de aproximadamente 700 μ L de sangue da região do plexo retro-orbital para a determinação das concentrações de acetaminofeno. Os resultados foram calculados conforme descrito na seção 3.5.5.4.

3.5.5 Avaliação *in vivo* do processo de esvaziamento gástrico

Após a etapa de validação, o protocolo foi executado com os animais experimentais com caquexia induzida. O protocolo de esvaziamento gástrico com solução teste de acetaminofeno foi realizado conforme Afshari e Liu (1988). No sétimo dia após a indução de caquexia, ou tratamento com solução salina 0,9%, os ratos foram alojados em gaiolas metabólicas, para jejum noturno por um período de 12 horas, com início às 18:00 horas.

3.5.5.1 Etapa pré-analítica: administração de acetaminofeno e coletas de sangue

No dia seguinte, após as 12 horas, realizou-se a contensão do primeiro rato do grupo experimental, o qual foi administrado, por via oral, com a solução-teste de acetaminofeno, preparada na concentração de 10 mg/mL, e administrada na dose de 100 mg/kg (MARD et al., 2016), em um volume de 1mL/100g de peso corporal. Imediatamente após, o mesmo foi administrado com a solução do anestésico geral, cetamina e xilazina, na dose de 100 mg/kg e 5 mg/kg, por via intramuscular, respectivamente.

Após a administração de acetaminofeno, foi acionado um cronômetro para a contagem do tempo total de 240 minutos, destinado à coleta das amostras de sangue, e, em seguida, procedeu-se prontamente com a primeira coleta, no tempo 0, de aproximadamente 700 μ L de sangue. O intervalo entre as administrações de acetaminofeno aos demais ratos do grupo experimental correspondeu a 10 minutos. As demais coletas foram realizadas nos tempos 15, 30, 60, 120 e 240 minutos após a administração da solução de acetaminofeno. O mapa dos tempos encontra-se no **Anexo A**.

O procedimento de coleta de amostras de sangue foi realizado, de forma adaptada, com base em Fernández et al. (2010), conforme descrito anteriormente. O sangue coletado foi acondicionado em microtubos, previamente marcados com a identificação do animal e o respectivo tempo da coleta. Após cada coleta de sangue, a região ocular foi higienizada com uma gaze umedecida com 1 mL de solução salina estéril.

Após o término de todas as coletas, realizou-se a aplicação da pomada oftálmica keravit®, com ação anti-inflamatória e antibiótica, para a preservação da integridade visual do animal. Também foi administrado o fármaco anti-inflamatório e analgésico, carprofeno, a uma dose de 5 mg/kg, por via subcutânea, com o intuito de promover a analgesia no período pós-coleta. Cada rato foi colocado em gaiola individual equipada com água filtrada.

3.5.5.2 *Etapa analítica: processamento das amostras*

Todos os microtubos com o sangue coletado permaneceram em repouso por um tempo de 30 minutos, necessário para a retração do coágulo. Após esse tempo, os mesmos foram acoplados em uma centrífuga, a qual foi programada para um perfil de rotação de 1.500 rcf por 12 minutos. Ao fim das centrifugações, com o auxílio de uma micropipeta, o soro obtido foi separado do coágulo e colocado em outros microtubos plásticos com a mesma identificação.

Para a obtenção de melhores resultados, o soro separado foi submetido a uma segunda centrifugação para a deposição de componentes celulares interferentes. Em seguida, foram separados outros tubos de ensaio, os quais receberam a mesma identificação daqueles utilizados para a coleta de sangue. Nestes tubos foi acrescentado, com o auxílio de uma espátula e balança analítica, um total de 100 mg (0,1 g) de cloreto de sódio (NaCl).

Com uma micropipeta, foram colocados, nos respectivos tubos com NaCl, 200 μ L de soro. Realizou-se uma leve homogeneização por 10 segundos, e foram acrescentados 500 μ L de acetato de etila. Logo após, o conteúdo dos tubos foi homogeneizado em um agitador magnético tipo vórtex, durante 30 segundos, e os mesmos ficaram em repouso por 5 minutos.

Ao fim do tempo de repouso, de cada tubo de ensaio foram retirados 200 μ L do sobrenadante formado, e colocados em outros tubos de ensaio com a mesma identificação. Em seguida, foram adicionados 100 μ L de ácido clorídrico (HCl 6N) ao sobrenadante. Os tubos foram colocados em uma estante de ferro e incubados em banho-maria, a uma temperatura de $100^{\circ} \pm 2^{\circ}$ C, por 10 minutos.

Após o tempo marcado, os tubos foram retirados e deixados em temperatura ambiente para resfriamento. Em seguida, foram adicionados em cada tubo, com uma pipeta de vidro graduada, 3 mL do Reagente de Cor, que foi preparado pela dissolução de 82 mg (0,082 g) de 2,5-dimetilfenol e 32 mg (0,032 g) de metaperiodato de sódio, em uma solução de hidróxido de potássio (KOH) a 0,4 M (2,24 g de KOH e 100 mL de água destilada).

Em seguida, duas alíquotas de 300 μ L foram coletadas da solução em cada tubo, com uma micropipeta, e colocadas em duas caselas de uma placa multi-poços. A leitura das absorvâncias foi feita em espectrofotômetro, a um comprimento de onda de 635 nm.

3.5.5.3 Curva de calibração da solução padrão

O Branco e a solução Padrão foram preparados mediante a obtenção de uma amostra de 5 mL de sangue total de um animal, previamente colocado em jejum, por 12 horas, com livre acesso à água, e não submetido ao tratamento com fármacos que podem causar interferências durante a etapa analítica, tais como: procainamida, acetaminofeno ou fenacetina (PRESCOTT, 1980).

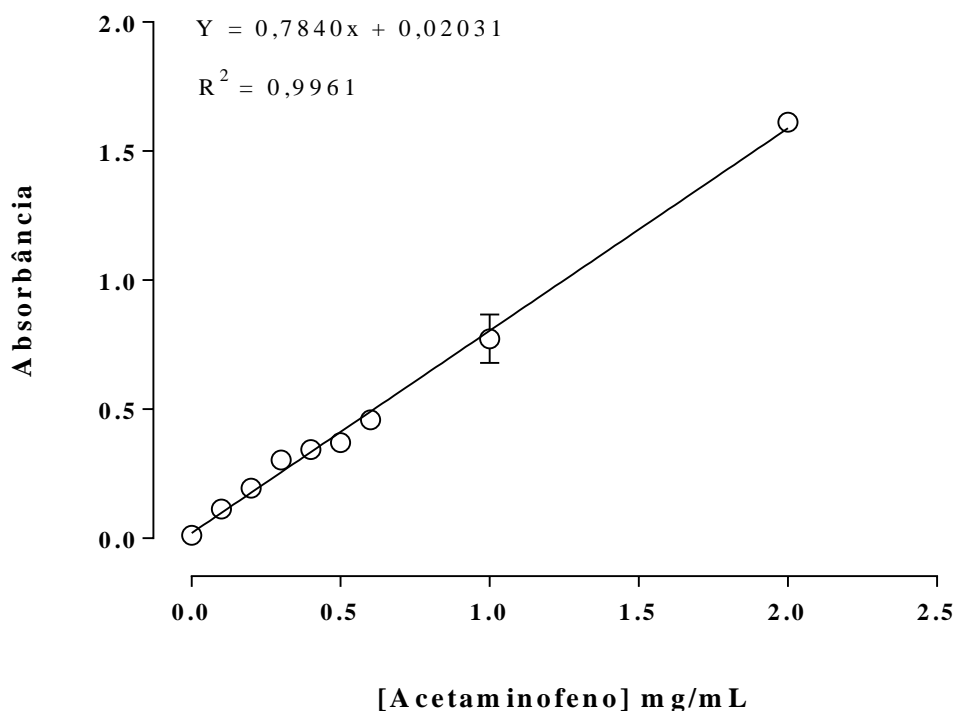
A amostra coletada foi centrifugada para a obtenção do soro. Deste, foram utilizados 200 μ L para o Branco do teste. O volume restante de soro foi empregado no preparo das soluções-padrão, conforme apresentado no **Quadro 3**, no qual foi utilizada uma solução estoque de acetaminofeno na concentração de 10 mg/mL.

Quadro 3 – Diluições da solução padrão para a construção da curva de calibração.		
Solução padrão	Preparo	Concentração final
I	04 μ L da sol. de acetaminofeno + 396 μ L de soro	0,1 mg/mL
II	08 μ L da sol. de acetaminofeno + 392 μ L de soro	0,2 mg/mL
III	12 μ L da sol. de acetaminofeno + 388 μ L de soro	0,3 mg/mL
IV	16 μ L da sol. de acetaminofeno + 384 μ L de soro	0,4 mg/mL
V	20 μ L da sol. de acetaminofeno + 380 μ L de soro	0,5 mg/mL
VI	24 μ L da sol. de acetaminofeno + 376 μ L de soro	0,6 mg/mL
VII	40 μ L da sol. de acetaminofeno + 360 μ L de soro	1,0 mg/mL
VIII	80 μ L da sol. de acetaminofeno + 320 μ L de soro	2,0 mg/mL

Legenda: sol.: solução. μ L: microlitros. mg: miligramas. mL: mililitros. **Fonte:** Própria.

Tanto o Branco do teste quando as soluções-padrão diluídas foram submetidos aos mesmos procedimentos descritos na etapa analítica para as amostras-testes. Em seguida, foram determinadas as absorbâncias médias, das quais foi subtraída a absorbância do Branco. Ao final, com o uso do software GraphPad Prism (versão 6.01), foi construída a curva de calibração (absorbância vs. concentração de acetaminofeno), apresentada na **Figura 19**.

Figura 19 – Curva de regressão linear (absorbância vs. concentração) das soluções-padrão de acetaminofeno.



Legenda: Valores da absorbância (variável dependente representada no eixo y) em função das concentrações das soluções-padrão de acetaminofeno (variável independente representada no eixo x). Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m.). R^2 : coeficiente de correlação. **Fonte:** Própria.

De acordo com a figura acima, foram obtidas as seguintes absorbâncias médias para cada concentração da solução-padrão: $0,113 \pm 0,011$ (para 0,1 mg/mL); $0,194 \pm 0,004$ (para 0,2 mg/mL); $0,303 \pm 0,002$ (para 0,3 mg/mL); $0,344 \pm 0,021$ (para 0,4 mg/mL); $0,370 \pm 0,018$ (para 0,5 mg/mL); $0,459 \pm 0,021$ (para 0,6 mg/mL); $0,773 \pm 0,094$ (para 1,0 mg/mL); e $1,612 \pm 0,002$ (para 2,0 mg/mL).

Devido à linearidade, evidenciada pelo valor de R^2 , entre os pontos representados na curva de regressão, optou-se por escolher um ponto único da curva de regressão linear. Os resultados foram, portanto calculados por meio do fator de calibração (FC), equivalente à razão entre a concentração do padrão [0,4 mg/mL] e a respectiva absorbância (0,344), conforme descrito adiante.

3.5.5.4 Etapa pós-analítica: determinação dos resultados

As concentrações de acetaminofeno ($\mu\text{g}/\text{mL}$) nas amostras-teste foram obtidas pelas fórmulas I e II, apresentadas no **Quadro 4**:

Quadro 4 – Fórmulas empregadas para a determinação das concentrações de acetaminofeno nas amostras-teste.	
I	$Abs_{media} = [(Abs1 + Abs2) / 2] - Abs_{Branco}$
II	$[Acetaminofeno] = Abs_{media} \times FC \times 1000$

Legenda: Abs_{media} : Absorbância média da amostra-teste; $Abs1$: Primeira absorbância lida da amostra-teste; $Abs2$: Segunda absorbância lida da amostra-teste; Abs_{Branco} : Absorbância do Branco (Valor: 0,049); $[Acetaminofeno]$: Concentração de Acetaminofeno na amostra-teste, em $\mu\text{g}/\text{mL}$; FC : Fator de Calibração da Solução Padrão (Valor: 1,162790); e 1000 : produto de conversão de unidades de mg/mL para $\mu\text{g}/\text{mL}$. **Fonte:** Própria.

Com os resultados calculados, construiu-se, com o uso do software GraphPad Prism (versão 6.01), o gráfico das concentrações de acetaminofeno (em $\mu\text{g} / \text{mL}$) vs. tempo (em minutos). Em seguida, a partir do gráfico construído, obteve-se a Área sob a Curva (AUC) para cada grupo experimental, a qual foi expressa em $\mu\text{g} \times \text{min} / \text{mL}$. A **Figura 20** apresenta de forma sintética os procedimentos realizados para a análise do esvaziamento gástrico.

Figura 20 – Representação das etapas realizadas para análise do esvaziamento gástrico



Legenda: mg/kg : miligrama por quilo. v.o. : via oral. nm : nanômetro. **Fonte:** Própria.

3.5.6 Avaliação *in vitro* da responsividade de órgãos gastrintestinais ao carbacol

O protocolo de responsividade ao carbacol foi realizado, de forma adaptada, segundo Croci et al. (1998), e Dick et al. (2000). No sétimo dia após a indução de caquexia, ou tratamento com solução salina a 0,9%, os ratos foram alojados em gaiolas metabólicas, para jejum noturno por um período de 12 horas, com início às 18:00 horas.

3.5.6.1 Obtenção de tiras longitudinais de fundo de estômago

No dia seguinte, após as 12 horas, em cada animal administrou-se o anestésico local, lidocaína, a uma dose de 10 mg/kg, por via intraperitoneal, e, em seguida, o anestésico tiopental sódico, a uma dose letal de 150 mg/kg de peso, por via intraperitoneal. Com o auxílio de uma tesoura cirúrgica, foi feita uma laparotomia.

Em seguida, as regiões dos esfíncteres cárdico e pilórico foram pinçadas, e realizou-se uma secção, com uma tesoura cirúrgica, de modo que o estômago foi separado do canal do esôfago e do intestino delgado, e colocado em uma placa de Petri com solução de Tyrode, de composição exibida no **Quadro 5**, e aerada com mistura carbogênica (O₂, 95%; CO₂, 5%).

Quadro 5 – Compostos utilizados no preparo da solução nutritiva de Tyrode.		
Componente	Fórmula química	Concentração (mM)
Cloreto de sódio	NaCl	136,0
Cloreto de potássio	KCl	5,0
Cloreto de magnésio	MgCl ₂	0,98
Cloreto de cálcio	CaCl ₂	2,0
Fosfato de sódio monobásico	NaH ₂ PO ₄	0,36
Bicarbonato de sódio	NaHCO ₃	11,9
Glicose	C ₆ H ₁₂ O ₆	5,5

Legenda: mM: milimolar. **Fonte:** Magalhães et al. (1998).

O estômago colocado na placa foi disposto, com auxílio de uma pinça não-dentada, em sua posição anatômica, e com uma pequena tesoura cirúrgica, realizou-se uma secção longitudinal ao longo da curvatura menor. O mesmo foi colocado em uma placa com parafina, também preenchida com solução nutritiva de Tyrode, aerada com mistura carbogênica, e, em seguida, fixado pelas extremidades, com o uso de pequenas agulhas.

Logo após, realizou-se uma secção na região limítrofe do corpo e fundo do estômago. O corpo do estômago foi descartado e o fundo foi devidamente fixado na placa de Petri com parafina. As extremidades, próximas às pequenas agulhas, foram cortadas de forma retilínea, e descartadas, visto que essa região pode apresentar certo grau comprometimento tecidual, devido à constante manipulação.

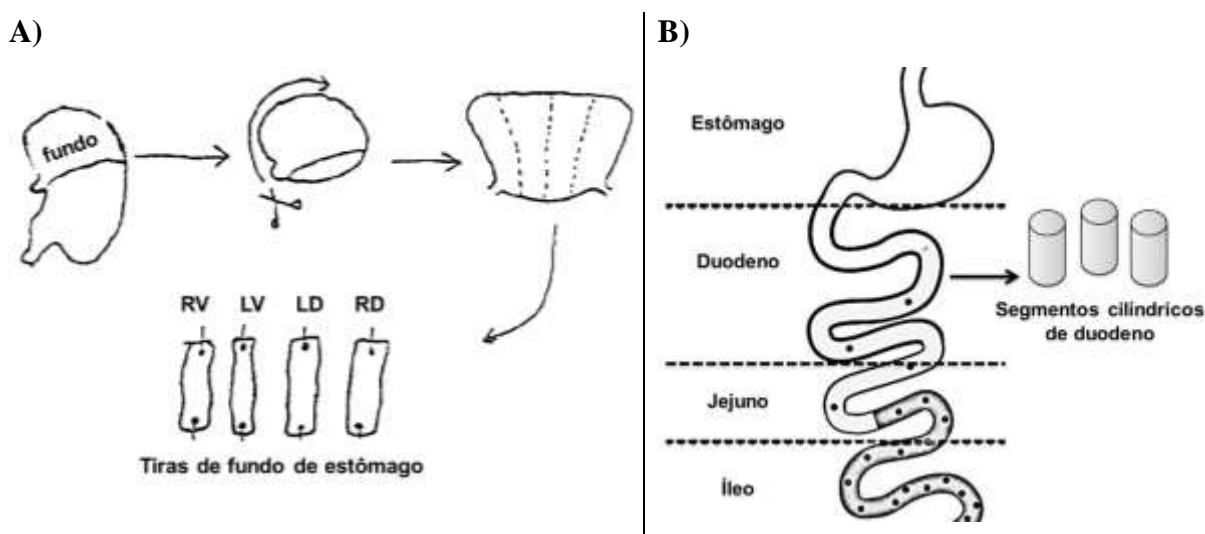
Após a secção das extremidades, foi obtido um formato ligeiramente retangular do fundo estômago, sobre o qual foram realizados cortes longitudinais, e obtidas quatro tiras de fundo de estômago, conforme apresentado na **Figura 22-A**. As tiras foram mantidas momentaneamente na placa de Petri com solução nutritiva.

3.5.6.2 Obtenção de segmentos de duodeno

O estômago foi coletado da cavidade abdominal juntamente com a região proximal do intestino delgado, correspondente ao duodeno, em um tamanho de aproximadamente 5 cm. Após a obtenção das tiras isoladas de fundo gástrico, iniciou-se o preparo dos segmentos de duodeno, previamente disposto em uma placa de Petri, preenchida com solução nutritiva de Tyrode, e aerada com mistura carbogênica (O_2 , 95%; CO_2 , 5%).

Com uma pequena tesoura cirúrgica, foram realizadas secções transversais, de modo que foram obtidos segmentos de duodeno, de aproximadamente 2 cm, com formato preservado, tal como representado na **Figura 21-B**, os quais foram mantidos momentaneamente na placa até a montagem no equipamento de aquisição de dados.

Figura 21 – Procedimento para obtenção das tiras de fundo gástrico e segmentos de duodeno.



Legenda: RV: tira ventral direita. LV: tira ventral esquerda. LD: tira dorsal esquerda. RD: tira dorsal direita.
Fonte: Adaptado de Riazi-Farzad, Nicholls e Sewell (1996).

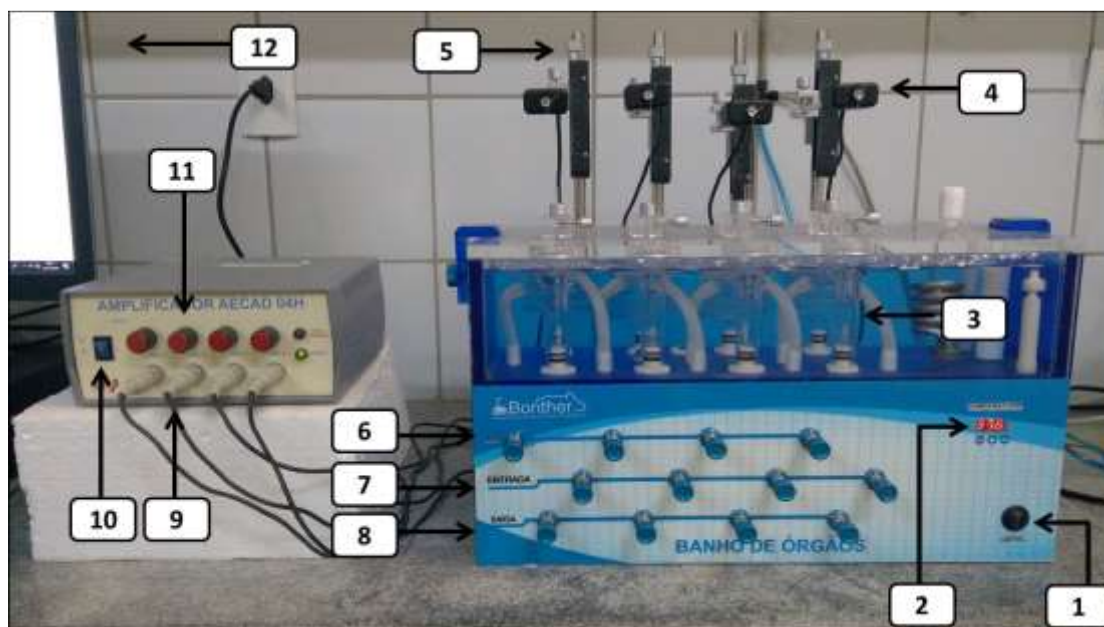
3.5.6.3 Montagem das tiras de fundo gástrico e segmentos de duodeno no sistema

Com o uso de uma linha de algodão e agulha, foi feita uma pequena argola na extremidade inferior de cada tira de fundo gástrico e segmento do duodeno. Na extremidade superior foi amarrada uma linha, em tamanho médio. Cada órgão foi fixado, pela argola na extremidade inferior, em uma haste de plástico, a qual foi acoplada verticalmente na cuba do banho de órgãos.

Em seguida, cada órgão foi conectado ao transdutor de força, pela linha na extremidade superior. Cada cuba foi preenchida com 5 mL da solução de Tyrode, e mantida a uma temperatura de 37 °C, com circulação de ar (O₂, 95%; CO₂, 5%) e pH 7,4, conforme Magalhães et al. (1998).

O registro das contrações foi realizado por meio de um sistema digital de aquisição de sinais biológicos (software AQCAD[®], versão 2.3.6, AVS Projetos, SP) conectado a cada transdutor de força, através de um amplificador de sinal, conforme apresentado na **Figura 22**. As tiras e segmentos montados no sistema foram mantidos em estado de equilíbrio, sob uma tensão estável de repouso de $1,0 \pm 0,2$ gf (grama-força).

Figura 22 – Sistema empregado no estudo da resposta contrátil de órgãos isolados.



Legenda: Imagem geral dos equipamentos utilizados para o estudo da contratilidade *in vitro* de órgãos isolados. 1 – Chave geral do banho de órgãos. 2 – Termostato controlador da temperatura. 3 – Cubo com o órgão isolado preenchida com solução de Tyrode. 4 – Transdutor de força. 5 – Regulador da tensão basal dos órgãos isolados. 6 – Botão regulador da entrada da mistura carbogênica. 7 – Botão regulador da entrada na solução de Tyrode na cuba. 8 – Botão regulador da saída da solução de Tyrode da cuba. 9 – Cabos acoplados ao amplificador de sinal. 10 – Chave geral do amplificador de sinal. 11 – Botão utilizado para a calibração inicial do transdutor de força. 12 – Computador com software para aquisição de sinais biológicos. **Fonte:** Própria.

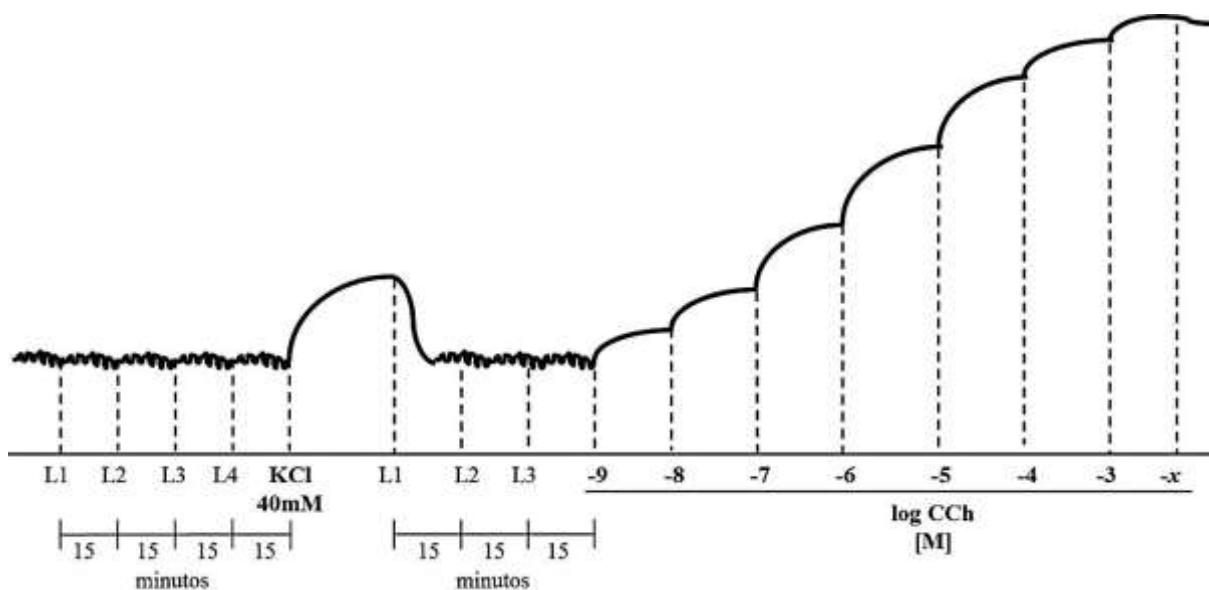
Em seguida, foram realizadas 4 lavagens, as quais consistiram na retirada, seguida da reposição da solução nutritiva de Tyrode, intercaladas por um tempo de 15 minutos. Após a quarta lavagem, o volume final de 5 mL foi adicionado na cuba, e aguardou-se um tempo de estabilização de 15 minutos.

Após o tempo de estabilização dos órgãos, a viabilidade dos mesmos foi avaliada com a adição de 100 μ L de uma solução de cloreto de potássio, preparada na concentração de 2 M (concentração na cuba: 40 mM), o qual é capaz de ocasionar contrações tônicas no músculo liso, através de um estímulo eletromecânico (OLIVEIRA et al., 2006). Foram considerados órgãos viáveis aqueles que apresentaram aumento imediato na tensão basal resultante da contração.

Aguardou-se um tempo de 10 minutos, e foram realizadas três lavagens com a solução de Tyrode, intercaladas por um tempo de 15 minutos, para o retorno das tiras de fundo gástrico e segmentos de duodeno à sua tensão basal. Após a terceira lavagem, o volume final de 5 mL foi adicionado na cuba, e aguardou-se um tempo de 15 minutos.

Ao fim deste tempo, deram-se início às adições das soluções de trabalho de carbacol, em concentrações cumulativas, conforme descrito na seção 3.5.6.5. A **Figura 23** apresenta um esquema geral das etapas de estabilização e contração do órgão isolado na cuba.

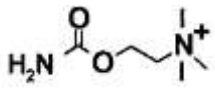
Figura 23 – Etapas de estabilização e contração de órgãos *in vitro*, ao estímulo eletromecânico, com cloreto de potássio, e farmacomecânico cumulativo com carbacol.



Legenda: Modelo hipotético de traçado resultante da contração de um órgão ao estímulo eletromecânico, com cloreto de potássio, e farmacomecânico, com carbacol. *KCl*: cloreto de potássio. *L1*, *L2*, *L3*, *L4*: lavagens (troca da solução nutritiva de Tyrode da cuba). *mM*: milimolar. *CCh*: carbacol. *M*: molar. **Fonte:** Própria.

3.5.6.4 Preparo das soluções de trabalho

De início, preparou-se a solução de estoque de carbacol, na concentração de 1 M. Após a determinação da massa de carbacol (m), conforme a fórmula presente no **Quadro 6**, foi realizada a dissolução do mesmo em água destilada, no volume final, e a solução estoque foi, então, utilizada para o preparo das demais soluções de trabalho.

Quadro 6 – Soluções de carbacol utilizadas e o respectivo modo de preparo.		
Solução estoque	Solução de trabalho	Preparo (Fórmula base: $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$)
 [CCh 1 M] $M = \frac{m}{MM \times V}$	$1,0 \times 10^{-1}$ M	100 μ L ($1,0 \times 10^0$ M) + 900 μ L (a.d.)
	$1,0 \times 10^{-2}$ M	100 μ L ($1,0 \times 10^{-1}$ M) + 900 μ L (a.d.)
	$1,0 \times 10^{-3}$ M	100 μ L ($1,0 \times 10^{-2}$ M) + 900 μ L (a.d.)
	$1,0 \times 10^{-4}$ M	100 μ L ($1,0 \times 10^{-3}$ M) + 900 μ L (a.d.)
	$1,0 \times 10^{-5}$ M	100 μ L ($1,0 \times 10^{-4}$ M) + 900 μ L (a.d.)
	$1,0 \times 10^{-6}$ M	100 μ L ($1,0 \times 10^{-5}$ M) + 900 μ L (a.d.)

Legenda: CCh: Carbacol. M : Molaridade da solução de estoque (Valor: 1×10^0 M); MM : Massa molecular de carbacol (Valor: 182,696 g/mol); V : Volume final da solução (Valor: 2 mL); e m : massa (em g) de carbacol a ser pesada. C_1 : concentração inicial. V_1 : volume inicial. C_2 : concentração final. V_2 : volume final. M : molar. μ L: microlitros. ad: água destilada. **Fonte:** Hacksell et al. (2002).

3.5.6.5 Contrações dos órgãos ao estímulo cumulativo com carbacol

Após o preparo das soluções de trabalho, foram iniciadas, com uma micropipeta, as adições cumulativas das mesmas nas cubas, preenchidas com 5 mL da solução de Tyrode, e com os órgãos gastrintestinais previamente montados. Após a adição de cada solução de trabalho, anotou-se o pico máximo de contração, em **grama-força (gf)**. A solução seguinte foi adicionada no instante e que foi possível observar uma queda do pico de tensão.

O protocolo, portanto, foi realizado até a adição da solução de trabalho que não resultou em um aumento na contração do órgão, para além do que foi obtido com a adição da solução anterior, observado através da tensão do mesmo. As soluções utilizadas encontram-se apresentadas no **Quadro 7**.

Quadro 7 – Concentrações cumulativas de carbacol e o respectivo volume adicionado.

X	Solução de trabalho	Volume adicionado na cuba	Concentração final na cuba
I	1×10^{-6} M	05 μ L	1×10^{-9} M
II	1×10^{-6} M	45 μ L	1×10^{-8} M
III	1×10^{-5} M	45 μ L	1×10^{-7} M
IV	1×10^{-4} M	45 μ L	1×10^{-6} M
V	1×10^{-3} M	45 μ L	1×10^{-5} M
VI	1×10^{-2} M	45 μ L	1×10^{-4} M
VII	1×10^{-1} M	45 μ L	1×10^{-3} M

Legenda: M: molar. μ L: microlitro. **Fonte:** Adaptado de Herlihy, Semenov e Brenner (2013).

3.5.6.6 Determinação dos resultados

Inicialmente, foi calculada a amplitude máxima de tensão (ΔT_{max}), e a tensão para cada concentração de carbacol na cuba ($T[CCh]$), as quais foram utilizadas para o cálculo dos resultados. Estes foram expressos em **porcentagem (%) de contração**, conforme apresentado pelas fórmulas I, II e III, no **Quadro 8**.

Quadro 8 – Fórmulas empregadas para a determinações das tensões relativas à cada concentração de carbacol.

I	$\Delta T_{max} = t_{max} - t_{basal}$
II	$T[CCh] = t - t_{basal}$
III	$\% \text{ contração} = (T[CCh] \times 100) / (\Delta t_{max})$

Legenda: ΔT_{max} : amplitude máxima de tensão; t_{max} : tensão máxima registrada após a adição da última solução de carbacol que não ocasionou contração do órgão; t_{basal} : tensão basal inicial registrada antes da adição da primeira solução de carbacol. $T[CCh]$: tensão registrada após a adição de cada solução de carbacol na cuba. **Fonte:** Própria.

Com os resultados devidamente calculados, construiu-se, com o uso do software estatístico GraphPad Prism (versão 6.01), uma curva de regressão não-linear normalizada, com o log das concentrações de carbacol vs. porcentagens de contração. Para cada n experimental determinou-se a concentração efetiva de carbacol, em log, que ocasionou 50% da resposta máxima de contração, designada como CE50. A CE50 total, expressa em **molar (M)**, foi, portanto, obtida por meio da média dos valores de todos os n 's experimentais.

3.5.7 Coleta de amostras de fundo gástrico para análises *in vitro*

Em cada rato foi administrado o anestésico local, lidocaína, a uma dose de 10 mg/kg, por via intraperitoneal, e do anestésico tiopental sódico, a uma dose letal de 150 mg/kg de peso, por via intraperitoneal. Em seguida, realizou-se uma laparotomia, com o uso de uma tesoura cirúrgica.

A região dos esfíncteres cárdico e pilórico foram pinçadas e seccionadas para a separação do estômago, o qual foi disposto em uma placa de Petri, colocada sobre uma placa de gelo, a fim de evitar a autólise. Com uma tesoura cirúrgica a região correspondente ao fundo gástrico foi separada. Este foi limpo com solução salina (0,9%) fria, seccionado e colocado em dois microtubos devidamente identificados, os quais foram imediatamente acondicionados no freezer, a -45 °C. Estas amostras foram destinadas ao protocolo de dosagem de citocinas.

3.5.8 Medida de citocinas em fundo gástrico

O protocolo para determinação de citocinas em amostras de fundo gástrico foi realizado, em colaboração, no Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer, (LAFICA), no *campus* da Universidade Federal do Ceará (UFC), em Fortaleza, e executado, de forma adaptada, conforme Souza et al. (2001).

3.5.8.1 *Preparo das amostras (Samples)*

As amostras coletadas foram retiradas do freezer e, em uma balança analítica, foram pesados 60 mg de cada amostra, sobre os quais foram adicionados 300 μ L de tampão salina-fosfato diluído, com inibidor de protease a 1%. A mistura foi processada em um macerador, para a formação de um homogenato. Este foi centrifugado 10.000 rotações por minuto (rpm), durante 15 minutos. O sobrenadante foi separado e colocado em microtubos, previamente identificados, os quais foram acondicionados no freezer a -45 °C.

3.5.8.2 *Diluição do anticorpo primário ou anticorpo de captura (Capture Ac)*

De antemão, em um pequeno béquer de vidro, o anticorpo de captura (30,5 μ L) foi diluído em tampão salina-fosfato (5,5 mL) na proporção de 1:180. Logo após, foram

adicionados 100 μ L da solução com anticorpo de captura nas caselas de uma placa multi-poços. Em seguida, a placa foi tampada, coberta com papel alumínio, e incubada no freezer a 4 °C, durante 12 horas (*overnight*).

3.5.8.3 Preparo do padrão (Standard)

A placa foi retirada do freezer, e os poços foram lavados com 300 μ L de tampão de lavagem (*wash buffer*). Logo após, em cada casela da placa foram colocados 300 μ L do reagente diluente, na concentração de 10 mg/mL, preparado através da dissolução de albumina sérica bovina (BSA) em tampão salina-fosfato (PBS). A placa permaneceu em temperatura ambiente, por 1 hora.

Após, esse tempo, lavou-se a placa 3 vezes com 300 μ L do tampão de lavagem (*wash buffer*). As soluções-padrão, disponibilizadas no kit de citocinas, referentes às citocinas IL-6, IL-1 β , e TNF- α , foram diluídas no Reagente diluente, conforme apresentado no **Quadro 9**.

Quadro 9 – Diluição das soluções-padrão para as citocinas determinadas.		
Citocina	Concentração inicial (C₁)	Concentração final (C₂)
IL-6	740 ng/mL	8000 pg/mL
IL-1β	290 ng/mL	4000 pg/mL
TNF-α	160 ng/mL	4000 pg/mL

Legenda: As diluições foram feitas com o emprego da fórmula: $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$. *ng*: nanograma. *mL*: mililitro. *pg*: picograma. **Fonte:** Própria.

3.5.8.4 Plaqueamento do padrão e das amostras

Foi utilizada uma placa multi-poços para cada tipo de citocinas. Após as diluições, foram adicionados 200 μ L da solução padrão, na concentração final, na casela A1. Nos poços A2 a A12, foram adicionados 100 μ L do reagente diluente (BSA 10 mg/mL). Logo após, foram feitas as microdiluições do padrão, mediante a retirada de 100 μ L do padrão no poço A1, os quais foram colocados no A2. Em seguida, do poço A2 para A3.

Esse processo foi repetido até o poço A11, do qual foi retirado e descartado um volume de 100 μ L. No poço A12 foram colocados 100 μ L do reagente diluente, correspondente ao Branco do teste (*Blank*). Nos demais poços foram adicionados 100 μ L das amostras. Em seguida, a placa foi coberta com papel alumínio, e incubada no freezer a 4 °C, por 12 horas (*overnight*).

3.5.8.5 Preparo do anticorpo de detecção (*Detection Ac*)

Inicialmente, realizou-se a diluição do anticorpo de detecção (30,5 μ L) em reagente diluente (5,5 mL), para a proporção final de 1:180. A placa foi retirada do freezer e lavada 3 vezes com tampão de lavagem (*wash buffer*). Logo após, foram adicionados 100 μ L do anticorpo de detecção em todos os poços, e incubou-se a placa novamente no freezer a 4 °C, por 2 horas. Ao final do tempo, a placa foi retirada e lavada 3 vezes com tampão de lavagem.

3.5.8.6 Preparo dos compostos amplificadores de sinal: estreptoavidina-HRP e substrato

A estreptoavidina-HRP (*Horseradish peroxidase*), disponibilizada no kit, foi preparada através da diluição em reagente diluente (BSA, na concentração de 10 mg/mL), na proporção final de 1:200. Por ser fotossensível, esta etapa foi realizada em ambiente escuro. Após a lavagem da placa, foram adicionados 100 μ L de estreptoavidina-HRP em cada poço. A placa foi coberta com papel alumínio, e incubada em temperatura ambiente por 20 minutos.

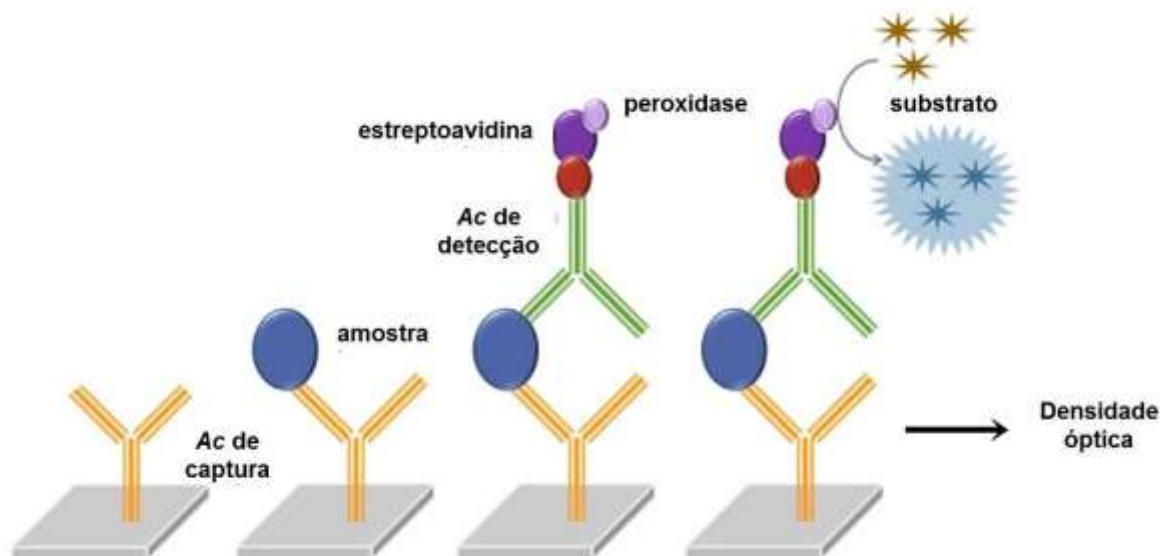
Após o tempo, a placa foi lavada 3 vezes com tampão de lavagem. Em seguida, foi preparado o substrato, também em ambiente escuro, mediante a adição, em um béquer de vidro, de 5 mL do Reagente A e 5mL do Reagente B. Foram adicionados 100 μ L do substrato em cada poço e a placa foi tampada, coberta com papel alumínio, e incubada em temperatura ambiente por 20 minutos.

Logo após, foram adicionados em cada poço, 50 μ L da solução de parada (*stop solution*), disponibilizada no kit para dosagem de citocina, e a placa foi imediatamente lida em espectrofotômetro, a um comprimento de onda de 450 nm.

3.5.8.7 Determinação dos resultados

Após a leitura das absorbâncias do padrão diluído de 1 a 1:1024 e das amostras, construiu-se a curva de calibração do padrão (absorbância vs. concentração do padrão), com o auxílio do software GraphPad Prism (versão 6.01). A partir da curva de calibração, determinaram-se as concentrações de citocinas. Em seguida, foi determinada a razão entre a concentração de citocinas e o peso da amostra (em mg), e o resultado final foi expresso como **citocinas / mg de fundo gástrico**. A **Figura 24** ilustra, de modo geral, o princípio do método de detecção de citocinas nas amostras de fundo gástrico.

Figura 24 – Representação esquemática do ensaio para detecção de citocinas.



Legenda: Sequência metodológica de adição de anticorpos primários e secundários e compostos amplificadores de sinal para determinação de citocinas. *HRP*: Horseradish peroxidase. **Fonte:** Adaptado de Vance et al. (2016).

3.5.9 Análise da densidade de neurônios mioentéricos

O protocolo de análise da densidade de neurônios do plexo mioentérico foi realizado, de forma adaptada, de acordo com Gabella (1969). No sétimo dia após a indução de caquexia, ou tratamento com solução salina, os ratos foram alojados em gaiolas metabólicas, para jejum noturno por um período de 12 horas, com início às 18:00 horas.

3.5.9.1 Coleta dos órgãos gastrintestinais

No dia seguinte, após as 12 horas, em cada animal foi administrado o anestésico local, lidocaína, a uma dose de 10 mg/kg, por via intraperitoneal, e, em seguida, o anestésico tiopental sódico, a uma dose letal de 150 mg/kg de peso, por via intraperitoneal. Com o auxílio de pinça-dentada e tesoura cirúrgica, foi feita uma laparotomia. Realizou-se uma secção próxima aos esfíncteres cárdico e pilórico, e o estômago foi removido e colocado em um recipiente com tampa, devidamente identificado e preenchido com solução de Krebs, cuja composição encontra-se mostrada no **Quadro 10**.

Quadro 10 – Compostos utilizados no preparo da solução nutritiva de Krebs.

Componente	Fórmula química	Concentração (M)
Cloreto de sódio	NaCl	0,120714
Cloreto de potássio	KCl	0,0059
Cloreto de magnésio	MgCl ₂ *6H ₂ O	0,0012
Cloreto de cálcio	CaCl ₂ *2H ₂ O	0,0025
Fosfato de sódio monobásico	NaH ₂ PO ₄	0,001356
Bicarbonato de sódio	NaHCO ₃	0,015517
Glicose	C ₆ H ₁₂ O ₆	0,0115

Legenda: O asterisco (*) indica a quantidade de moléculas de água presentes na composição. *M*: molar. **Fonte:** Adaptado de Silva, Natali e Prado (2008).

Logo após, o intestino delgado foi cuidadosamente removido dos anexos mesentéricos estendido até a região da junção ileocecal, e dividido em três partes iguais. A porção final da terça parte, correspondente ao íleo, foi coletada e colocada também em um recipiente com tampa preenchido com solução de Krebs, conforme citado no parágrafo anterior.

Em seguida, localizou-se o intestino grosso e, com o auxílio de pinça e tesoura para a remoção dos tecidos anexos, a porção correspondente ao cólon foi coletada e acondicionada em um recipiente com tampa e preenchido com solução de Krebs. Todos os órgãos permaneceram imersos na solução nutritiva por 1 hora, em temperatura ambiente (25 °C).

3.5.9.2 Preparo, lavagem dos órgãos e acondicionamento no meio de incubação

Decorrido o tempo de 1 hora, uma das extremidades de cada órgão coletado foi cuidadosamente amarrada e fechada com linha. Na outra extremidade introduziu-se uma seringa preenchida com a solução nutritiva, a qual foi despejada no interior do órgão, até a completa distensão do mesmo. Ao fim, a abertura foi amarrada para a retenção da solução.

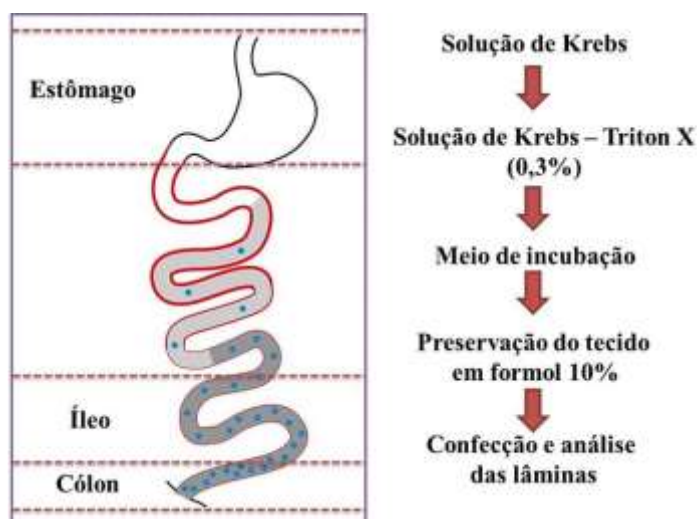
A solução nutritiva dos recipientes foi descartada e os mesmos foram preenchidos com uma nova solução. Os órgãos preenchidos foram então acondicionados nos respectivos recipientes, por um tempo de 10 a 30 minutos. Após isso, foram colocados em outros recipientes preenchidos com solução de Krebs-Triton X (0,3%), durante 2 a 10 minutos.

Decorrido esse tempo, os órgãos foram colocados em recipientes preenchidos somente com solução de Krebs e, a cada 10 minutos, a solução nutritiva foi descartada e trocada por uma nova solução, por um total de quatro vezes. Ao fim do tempo da última troca, os órgãos

foram colocados, por um tempo de 4 horas, em outros recipientes preenchidos com o meio de incubação. Um volume total de 100 mL do meio foi preparado com: 25 mL de nitroblue tetrazolium (NBT 0,5 mg/mL), 25 mL de tampão fosfato (0,1 M pH 7,3), 50 mL de água destilada, e 0,05 g de dinucleotídeo adenina nicotinamida reduzida (NADH 0,5 mg/mL).

Ao final, cada órgão foi retirado do meio de incubação, e colocado em uma placa para análise sob microscópio estereoscópico, para comprovação visual da marcação neuronal. Feito isso, foram colocados prontamente em recipientes preenchidos com formol tamponado a 10%. A **Figura 25**, a seguir, apresenta as etapas referentes à análise da densidade neuronal.

Figura 25 – Etapas experimentais referentes à análise de neurônios mioentéricos.



Legenda: Etapas da técnica de marcação histoquímica de neurônios mioentéricos em tecidos gastrintestinais: manutenção da viabilidade, coloração, preservação tecidual, preparo e análise das lâminas. **Fonte:** Própria.

3.5.9.3 Confeção das lâminas em microscopia estereoscópica

No dia seguinte, cada órgão foi retirado do recipiente com formol e colocado em uma placa de Petri. Com o auxílio de pinça não-dentada e bisturi, foi seccionada uma pequena parte do fundo gástrico e o órgão foi recolocado no formol, para a preservação do mesmo. A parte do fundo do estômago seccionada foi limpa com PBS e posicionada na placa com a camada mucosa voltada para cima.

Com o uso de pinças cirúrgicas, em um microscópio estereoscópico, a camada mucosa e submucosa foi cuidadosamente removida. Em seguida, a borda mesentérica foi seccionada com um bisturi, e o tecido foi colocado em um microtubo preenchido com PBS. O mesmo procedimento foi repetido com o íleo e o cólon coletados.

Em seguida, o tecido acondicionado no microtubo foi retirado e colocado em uma lâmina de vidro, previamente higienizada e identificada em uma das extremidades com um pincel marcador permanente. Sobre o tecido foram colocadas duas gotas de PBS para a distensão do mesmo, o qual foi posicionado adequadamente com o auxílio de um microscópio estereoscópico. Feito isso, pequenos pedaço de papel filtro foram colocados sucessivamente nas bordas do tecido para a absorção e remoção completa do PBS.

Logo após, foi colocada de uma a duas gotas de glicerina tamponada a 70% sobre o tecido distendido na lâmina, o qual foi coberto com lamínula de vidro, previamente higienizada com álcool. As bordas da lamínula foram seladas com esmalte de coloração transparente e a lâmina foi posta para secagem em temperatura ambiente, a 25 °C, preferencialmente na posição horizontal para o não extravasamento acidental da glicerina, ou acúmulo da mesma em uma única região da lâmina.

3.5.9.4 *Análise das lâminas em microscopia óptica e cálculo dos resultados*

Cada lâmina foi analisada em microscópio óptico (Olympus CX41), e foi realizada a contagem de neurônios presentes em um total de 40 campos de gânglios neuronais, observados sob aumento de 1000x. A densidade neuronal foi determinada pela média da contagem absoluta de neurônios, de acordo com a fórmula apresentada no **Quadro 11**.

Quadro 11 – Fórmula empregada para a determinação da densidade neuronal.

$$DN = \frac{\Sigma (cp1, cp 2 \dots cp40)}{40}$$

Legenda: DN: Densidade Neuronal; Σ : Somatório; cp: campo microscópico observado. **Fonte:** Própria.

3.6 Fármacos, reagentes e células tumorais AH-130

Os fármacos utilizados para o tratamento dos animais experimentais: atenolol e win 55,212-2, os compostos utilizados no protocolo de esvaziamento gástrico: acetaminofeno, cloreto de sódio, hidróxido de potássio, dimetilfenol e metaperiodato de sódio, e os anestésicos cetamina e xilazina foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Também foram obtidas da mesma fonte o carbacol e as substâncias utilizadas no preparo da solução de Tyrode, empregada no protocolo de contratilidade *in vitro*, e da solução de nutritiva de Krebs, usada na determinação de neurônios mioentéricos: cloreto de sódio, cloreto de potássio, cloreto de magnésio, cloreto de cálcio, fosfato de sódio monobásico, bicarbonato de sódio e glicose. As células tumorais de hepatoma-ascite (Yoshida AH-130) foram gentilmente doadas pelo Professor Doutor Emídio Marques de Matos Neto, do departamento de Educação Física da Universidade Federal do Piauí (UFPI).

3.7 Análise estatística

Os dados referentes aos gráficos de variação de peso corporal, consumo alimentar, índice de caquexia, esvaziamento gástrico (curva de concentração de acetaminofeno *vs.* tempo), e contratilidade *in vitro* (curva de concentração de carbacol *vs.* porcentagem de contração) foram apresentados como média \pm erro padrão da média (e.p.m.).

Enquanto que os dados referentes ao gráfico de contratilidade *in vitro* (log da concentração efetiva de carbacol que causou 50% da resposta máxima, CE50) foram expressos como mediana [(percentil 25%) – (percentil 75%)].

A variância entre as médias dos grupos experimentais foi analisada através de Teste t-*Student* não pareado (para as variações dentro de dois grupos independentes), ANOVA one-way (para as variações dentro de três ou mais grupos em função de um parâmetro) e ANOVA two-way (para as variações dentro de três ou mais grupos em função de dois parâmetros).

Estes dois últimos foram seguidos de teste de Tukey (*post-hoc*), para a determinação da significância entre as médias. As diferenças com $p < 0,05$ foram consideradas significativas. As análises estatísticas foram realizadas com o software GraphPad Prism, versão 6.01 para Windows.

Resultados

4 RESULTADOS

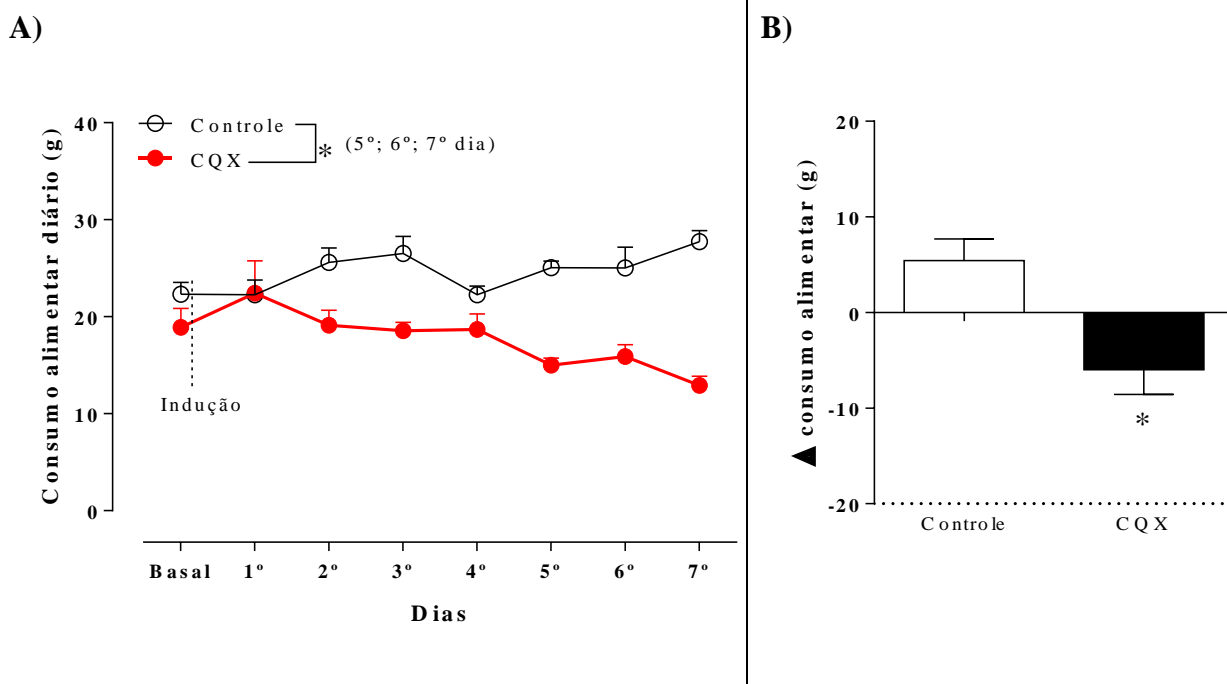
4.1 Caracterização de alterações fisiológicas de ratos com caquexia

4.1.1 Variação do consumo alimentar de ratos com caquexia

A **Figura 26-A** apresenta o consumo alimentar diário em função dos grupos experimentais. Foi possível observar que, em comparação ao grupo “Controle”, o grupo “Caquexia” (CQX) mostrou uma redução estatisticamente significativa ($p < 0,05$) na ingestão alimentar no 5º dia ($25,1 \pm 0,7$ g vs. $15,0 \pm 0,7$ g); 6º dia ($25,0 \pm 2,1$ g vs. $15,9 \pm 1,2$ g) e 7º dia ($27,7 \pm 1,2$ g vs. $12,9 \pm 0,9$ g).

A **Figura 26-B** apresenta a variação total de consumo alimentar para os grupos experimentais. Observou-se que, em comparação ao grupo “Controle”, o grupo “Caquexia” mostrou uma diminuição estatisticamente significativa ($p < 0,05$) na variação de consumo alimentar ($5,4 \pm 2,3$ g vs. $-5,9 \pm 2,6$ g).

Figura 26 – Perfil de consumo alimentar de ratos com caquexia induzida.



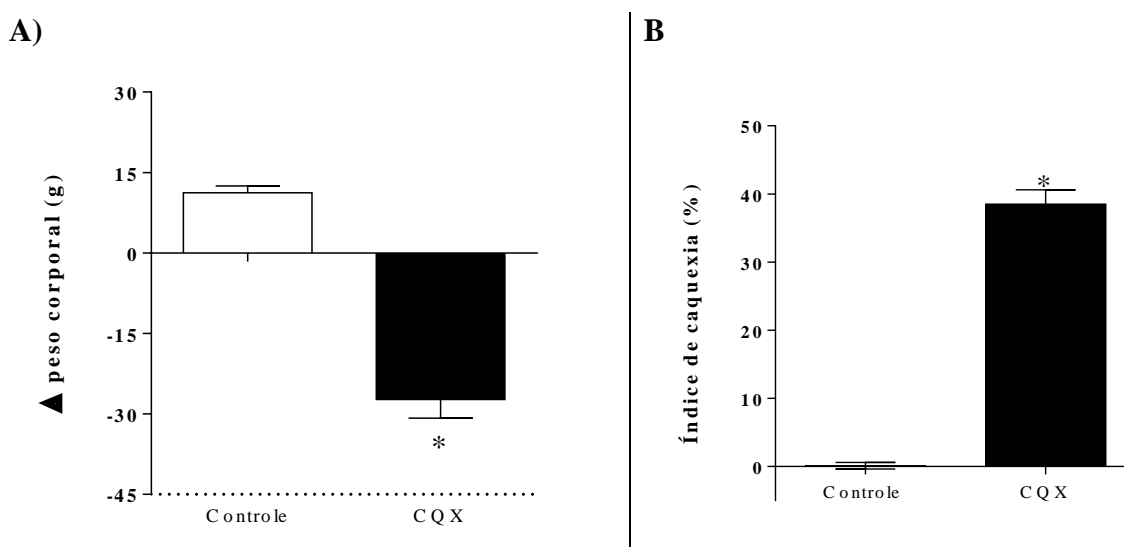
Legenda: Valores médios de consumo alimentar diário (em **A**), e variação (Δ) de consumo alimentar (em **B**) referentes aos grupos Controle (n=4) e Caquexia (n=4). Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m.), e analisados estatisticamente por ANOVA two-way, seguido de teste de Tukey (em **A**), e Teste t-Student não pareado (em **B**). *: $p < 0,05$ (Em **A** e **B**: CQX vs. Controle). A linha tracejada (em **A**) representa a indução de caquexia, realizada após a coleta dos dados referentes ao consumo basal **Fonte:** Própria.

4.1.2 Variação de peso corporal e Índice de caquexia (IC%) dos animais experimentais com caquexia induzida por células de Yoshida AH-130

A **Figura 27-A** apresenta os valores da variação de peso corporal em função dos grupos experimentais. Foi possível observar que, em comparação ao grupo “Controle”, o grupo “Caquexia” (CQX) mostrou uma variação negativa estatisticamente significativa ($p < 0,05$) no peso corporal ($11,2 \pm 1,3$ g vs. $-27,3 \pm 3,5$ g).

A **Figura 27-B** apresenta os valores do Índice de caquexia (IC%) em função dos grupos experimentais. Foi possível observar que, em comparação ao grupo “Controle”, o grupo “Caquexia” mostrou um aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) no índice de caquexia ($0,1 \pm 0,5\%$ vs. $38,5 \pm 2,1\%$).

Figura 27 – Delta de peso corporal e Índice de caquexia dos animais com caquexia induzida.



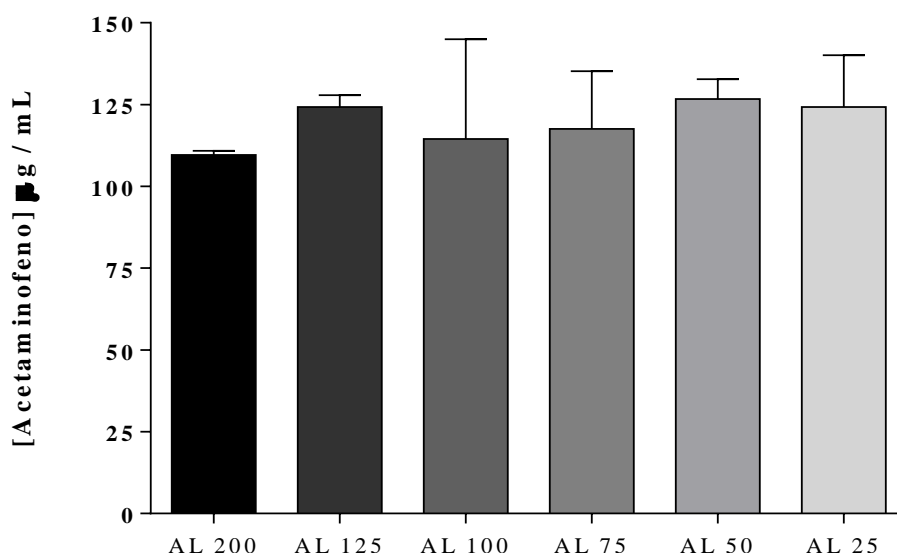
Legenda: Valores médios da variação de peso corporal (em **A**), e do Índice de Caquexia (IC%) (em **B**) referentes aos grupos experimentais Controle (n=9) e Caquexia (CQX, n=8). Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m.), e analisados estatisticamente por Teste *t-Student* não pareado (em **A** e **B**). g: gramas. *: $p < 0,05$ (Em **A** e **B**: CQX vs. Controle). **Fonte:** Própria.

4.2 Validação do teste de absorção de acetaminofeno como método de estudo do esvaziamento gástrico

4.2.1 Efeito de variações volumétricas nas amostras-testes sobre a sensibilidade do teste de absorção de acetaminofeno.

A **Figura 28** apresenta os valores das concentrações séricas de acetaminofeno em função dos grupos experimentais representados pelas alíquotas de soro. Em comparação ao grupo “AL 200”, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) nos grupos: “AL 125” ($109,6 \pm 1,2 \mu\text{g/mL}$ vs. $124,2 \pm 3,7 \mu\text{g/mL}$), “AL 100” ($109,6 \pm 1,2 \mu\text{g/mL}$ vs. $114,5 \pm 30,5 \mu\text{g/mL}$), “AL 75” ($109,6 \pm 1,2 \mu\text{g/mL}$ vs. $117,5 \pm 17,7 \mu\text{g/mL}$), “AL 50” ($109,6 \pm 1,2 \mu\text{g/mL}$ vs. $126,7 \pm 6,1 \mu\text{g/mL}$), e “AL 25” ($109,6 \pm 1,2 \mu\text{g/mL}$ vs. $124,2 \pm 15,8 \mu\text{g/mL}$).

Figura 28 – Concentrações séricas de acetaminofeno determinadas a partir de variações volumétricas nas amostras de soro.



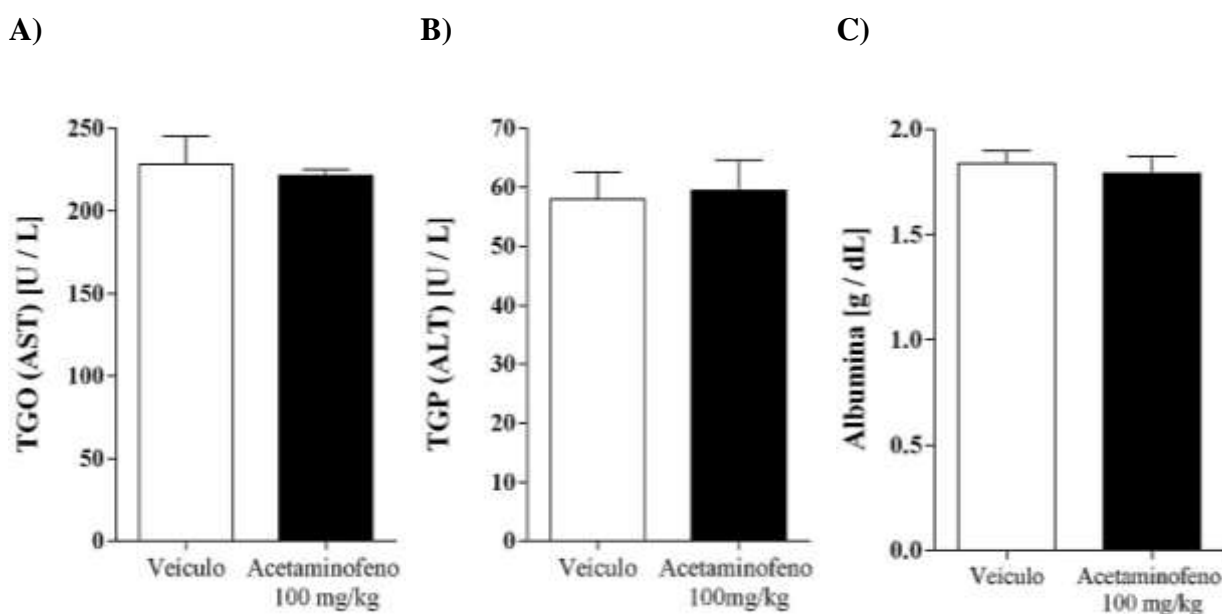
Legenda: Valores médios de acetaminofeno referentes aos grupos experimentais: AL 200, AL 125, AL 100, AL 75, AL 50, e AL 25. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m.), e analisados estatisticamente por ANOVA one-way, seguido de teste de Tukey. *AL*: alíquota. $\mu\text{g/dL}$: micrograma por decilitro. μL : microlitro. **Fonte:** Própria.

4.2.2 Efeito da administração da solução teste de acetaminofeno sobre os marcadores bioquímicos de função hepática de ratos

As **Figuras 29-A e 29-B** apresentam os valores de aminotransferases em função dos grupos experimentais. Em comparação ao grupo “Veículo”, o grupo “Acetaminofeno 100 mg/kg”, não apresentou diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$), tanto para TGO/AST ($228,3 \pm 17,0$ U/L vs. $221,7 \pm 3,4$ U/L), quanto para TGP/ALT ($58,0 \pm 4,6$ U/L vs. $59,5 \pm 5,1$ U/L).

A **Figura 29-C** apresenta os valores de albumina em função dos grupos experimentais. Em comparação ao grupo “Veículo”, o grupo “Acetaminofeno 100mg/kg”, não mostrou diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) ($1,8 \pm 0,1$ g/dL vs. $1,8 \pm 0,1$ g/dL).

Figura 29 – Marcadores bioquímicos de função hepática de ratos normais após a administração da solução teste de acetaminofeno.

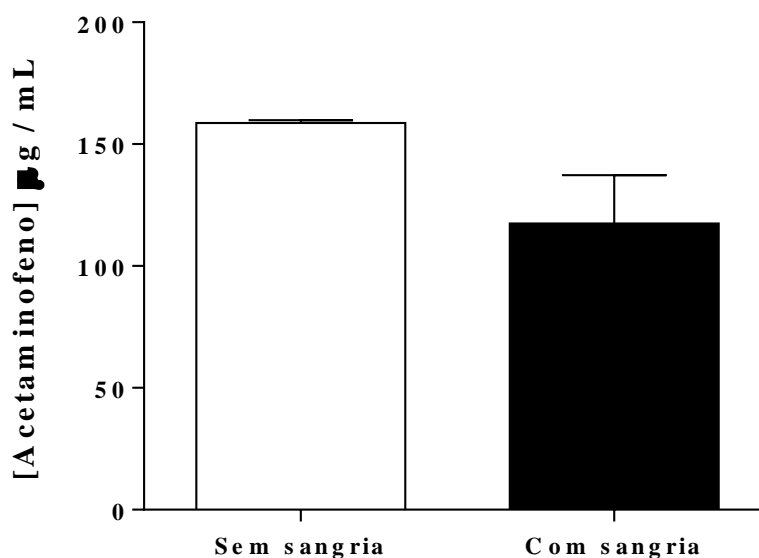


Legenda: Valores médios de transaminase glutâmico oxalacética (TGO/AST, em **A**), transaminase glutâmico pirúvica (TGP/ALT, em **B**), e albumina (em **C**), referentes aos grupos experimentais Veículo (n=4) e Acetaminofeno 100 mg/kg (n=4). Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m), e analisados estatisticamente por Teste *t-Student* não pareado (em **A**, **B** e **C**). **Fonte:** Própria.

4.2.3 Efeito de variações negativas prévias da volemia sobre o esvaziamento gástrico de ratos

A **Figura 30** apresenta os valores médios das concentrações de acetaminofeno em função dos grupos experimentais. Não foram observadas variações nas concentrações de acetaminofeno quando se comparou o grupo “Sem sangria” ao grupo “Com sangria” ($158,7 \pm 1,1 \mu\text{g/mL}$ vs. $117,5 \pm 19,9 \mu\text{g/mL}$).

Figura 30 – Concentrações séricas de acetaminofeno de ratos normais submetidos a uma modulação negativa prévia da volemia.



Legenda: Valores médios de acetaminofeno relativos aos grupos experimentais “Sem sangria” (n=3), e “Com sangria” (n=3). Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m.), e analisados estatisticamente por Teste *t-Student* não pareado. **Fonte:** Própria.

4.3 Caracterização de alterações gastrintestinais de ratos com caquexia

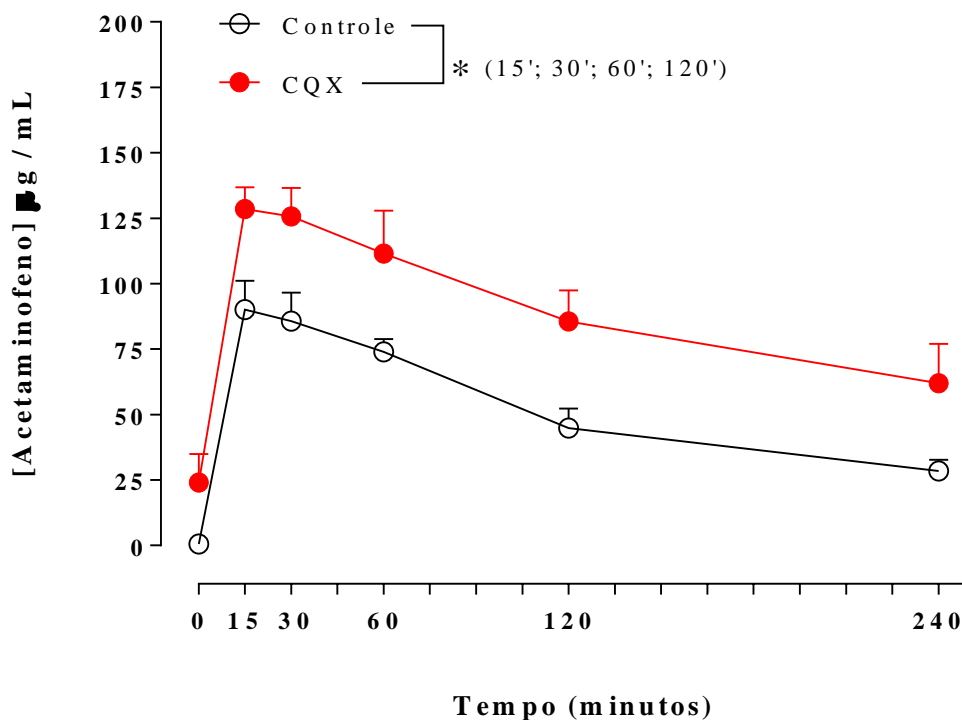
4.3.1 Perfil de esvaziamento gástrico *in vivo* de ratos com caquexia induzida

A **Figura 31-A** apresenta as concentrações médias de acetaminofeno, em função dos seis pontos de tempo, obtidas para os grupos experimentais. Em comparação ao grupo “Controle”, foi observado que o grupo “Caquexia” (CQX) apresentou aumento significativo ($p < 0,05$) nas concentrações séricas de acetaminofeno nos tempos: 15 minutos ($90,1 \pm 10,9 \mu\text{g/mL}$ vs. $128,5 \pm 8,3 \mu\text{g/mL}$), 30 minutos ($85,7 \pm 10,8 \mu\text{g/mL}$ vs. $125,6 \pm 10,9 \mu\text{g/mL}$), 60 minutos ($73,9 \pm 4,9 \mu\text{g/mL}$ vs. $111,5 \pm 16,3 \mu\text{g/mL}$) e 120 minutos ($44,8 \pm 7,4 \mu\text{g/mL}$ vs. $85,5 \pm 11,9 \mu\text{g/mL}$).

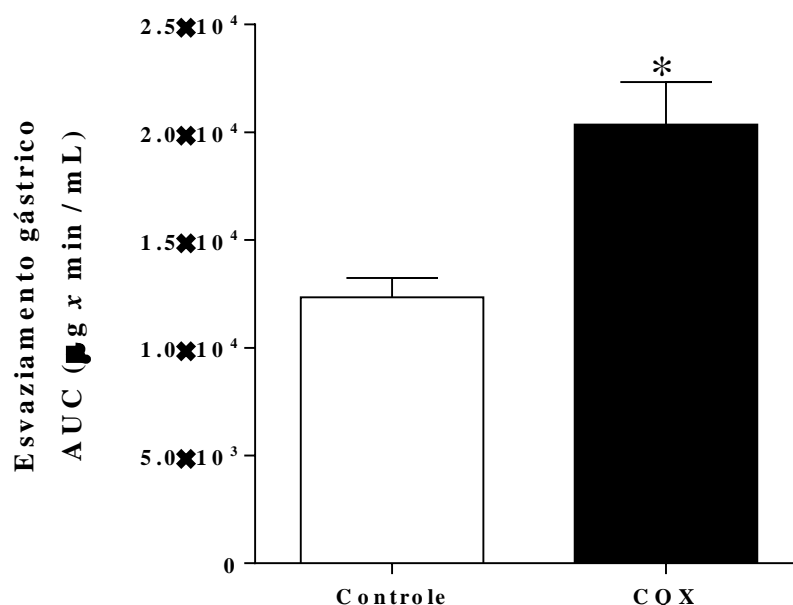
Na **Figura 31-B** são apresentados os valores médios da área sob a curva (AUC) em função dos grupos experimentais. Comparado ao grupo “Controle”, observou-se um aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) na AUC dos ratos do grupo “Caquexia” ($12.349,8 \pm 890,5 \mu\text{g} \times \text{min/mL}$ vs. $20.360,2 \pm 1.970,9 \mu\text{g} \times \text{min/mL}$).

Figura 31 – Perfil de esvaziamento gástrico de ratos com caquexia.

A)



B)



Legenda: Curvas de concentrações de acetaminofeno vs. tempo (em A) e Valores de área sob a curva (AUC) (em B) referentes aos grupos experimentais Controle (n=5) e Caquexia (CQX, n=6). Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m.), e analisados estatisticamente por ANOVA two-way, seguido de teste de Tukey (em A), e Teste *t-Student* não pareado (em B). *: $p < 0,05$ (Em A e B: CQX vs. Controle). **Fonte:** Própria.

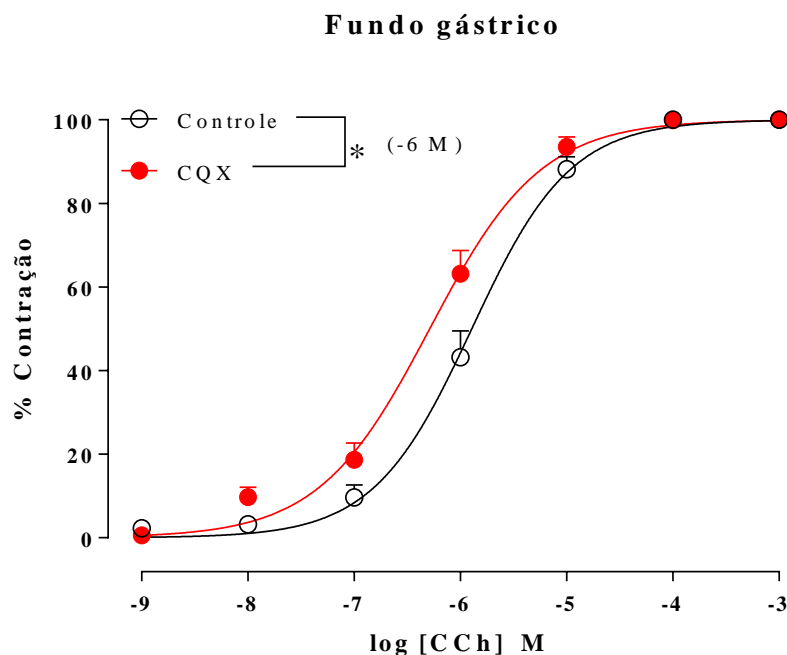
4.3.2 Perfil de contratilidade *in vitro* de tiras isoladas de fundo gástrico de ratos com caquexia ao estímulo colinérgico com carbacol

A **Figura 32-A** apresenta as porcentagens médias de contração de tiras isoladas de fundo gástrico, em função de concentrações cumulativas de carbacol, para os grupos experimentais. Foi possível observar que, em comparação ao grupo “Controle”, o grupo “Caquexia” (CQX) mostrou um aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) na porcentagem de contração referente à concentração de carbacol (em log) de -6 M ($43,2 \pm 6,3\%$ vs. $63,2 \pm 5,5\%$).

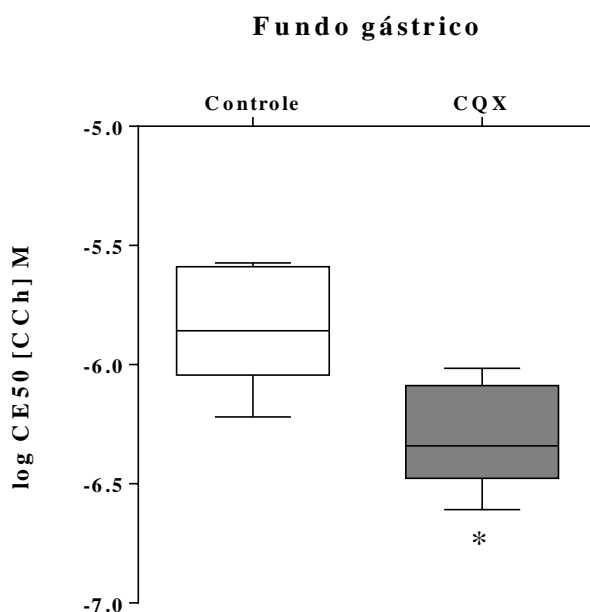
A **Figura 32-B** apresenta os valores medianos das concentrações de carbacol (em log) que ocasionaram metade (50%) da resposta máxima (CE50), para os grupos experimentais. Foi possível observar que, em comparação ao grupo “Controle”, o grupo “Caquexia” mostrou uma diminuição estatisticamente significativa ($p < 0,05$) da CE50: $-5,8 \text{ M}$ [$(-6,0 \text{ M}) - (-5,6 \text{ M})$] vs. $-6,3 \text{ M}$ [$(-6,5 \text{ M}) - (-6,1 \text{ M})$].

Figura 32 – Contratilidade de tiras isoladas de fundo gástrico de ratos com caquexia.

A)



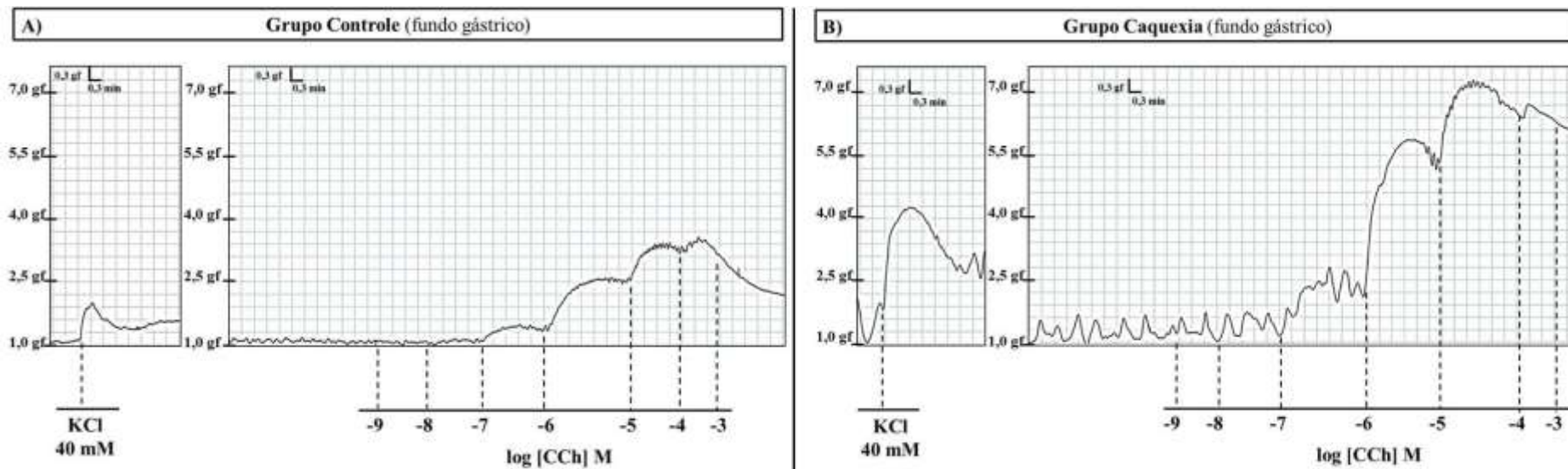
B)



Legenda: Curvas sigmóides de porcentagens de contração de tiras de fundo gástrico em função de concentrações cumulativas de carbacol (em log), -9 M a -3 M (em **A**), e Valores de CE50 (em **B**), referentes aos grupos experimentais Controle (n=6) e Caquexia (CQX, n=5). Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m.) (em **A**) e mediana [(percentil 25%) – (percentil 75%)] (em **B**), e analisados estatisticamente por ANOVA two-way, seguido de teste de Tukey (em **A**), e Teste *t-Student* não pareado (em **B**). M: molar. *: $p < 0,05$ (Em **A** e **B**: CQX vs. Controle). **Fonte:** Própria.

A **Figura 33** apresenta os registros da resposta contrátil de tiras isoladas de fundo gástrico, que relacionam a tensão (em grama-força, gf) em função do estímulo colinérgico cumulativo (CCh -9 M a -3 M, em log), em sucessivos pontos de tempo, para os grupos experimentais: “Controle” e “Caquexia”.

Figura 33 – Registros originais da contratilidade *in vitro* de tiras de fundo gástrico de ratos com caquexia.



Legenda: Traçados produzidos pela resposta contrátil de tiras isoladas de fundo gástrico, frente ao estímulo colinérgico cumulativo (em log: -9 M a -3 M), referentes aos grupos experimentais Controle (em **A**) e Caquexia (em **B**). *gf*: grama-força. *min*: minutos. *mM*: milimolar. *M*: molar. Escala: 0,3gf: 0,3min. **Fonte:** Própria.

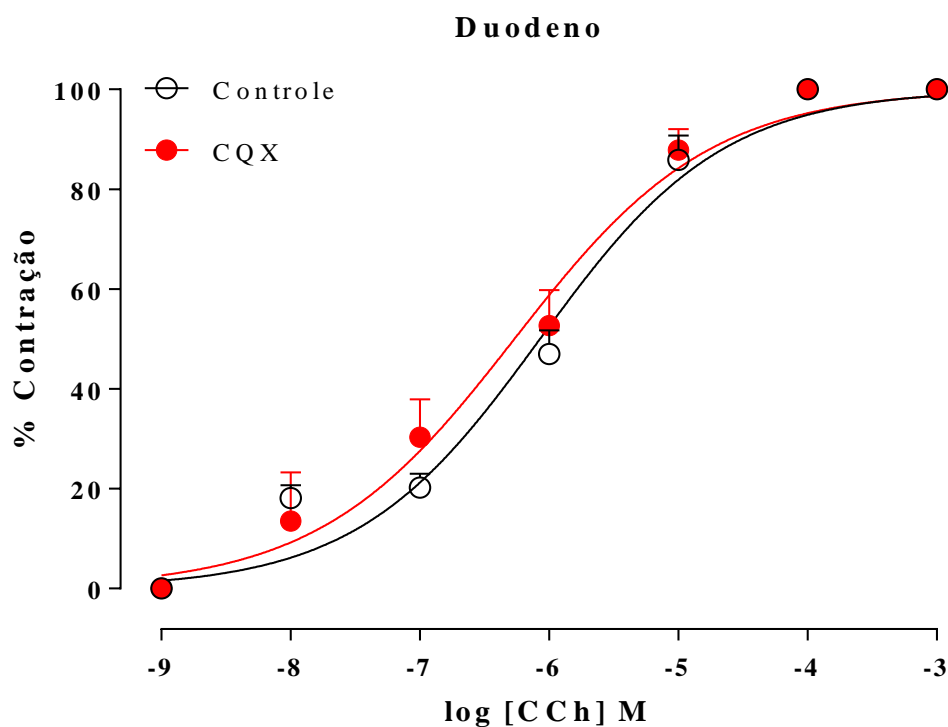
4.3.3 Perfil de contratilidade *in vitro* de segmentos de duodeno de ratos com caquexia ao estímulo colinérgico com carbacol

A **Figura 34-A** apresenta as porcentagens médias de contração de segmentos de duodeno, em função de concentrações cumulativas de carbacol, para os grupos experimentais. Foi possível observar que, em comparação ao grupo “Controle”, o grupo “Caquexia” (CQX) não mostrou diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) nas porcentagens de contração, para cada concentração de carbacol, em log: -9 M ($0,0 \pm 0,0\%$ vs. $0,0 \pm 0,0\%$), -8 M ($18,1 \pm 2,6\%$ vs. $13,5 \pm 9,8\%$), -7 M ($20,2 \pm 2,8\%$ vs. $30,3 \pm 7,6\%$), -6 M ($47,0 \pm 4,7\%$ vs. $52,7 \pm 7,1\%$), -5 M ($85,9 \pm 4,8\%$ vs. $87,8 \pm 4,2\%$), -4 M ($100,0 \pm 0,0\%$ vs. $100,0 \pm 0,0\%$), e -3 M ($100,0 \pm 0,0\%$ vs. $100,0 \pm 0,0\%$).

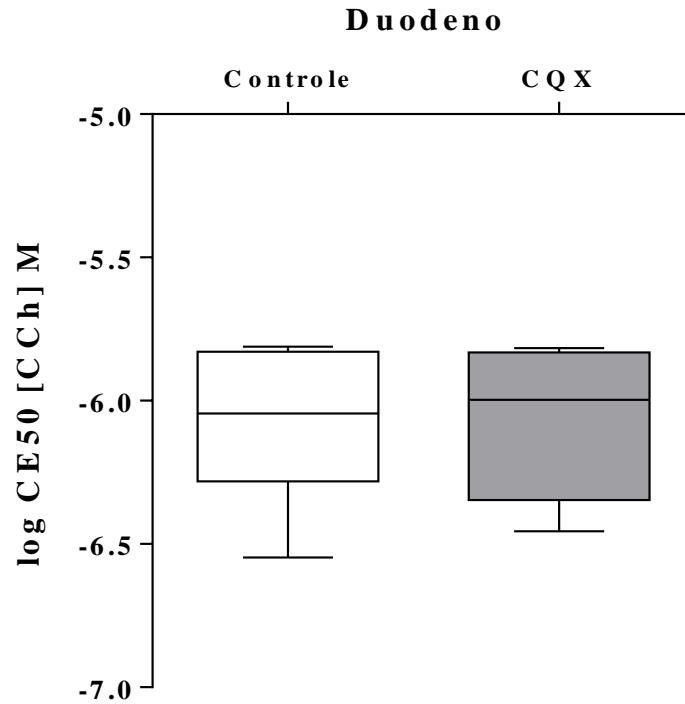
A **Figura 34-B** mostra as concentrações de carbacol (em log) que ocasionaram metade (50%) da resposta máxima (CE50), para os grupos experimentais. Observou-se que, em comparação ao grupo “Controle”, o grupo “Caquexia” não mostrou diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) na CE50: -6,0 M [(-6,3 M) – (-5,8 M)] vs. -5,9 M [(-6,3 M) – (-5,8 M)].

Figura 34 – Contratilidade de segmentos de duodeno de ratos com caquexia.

A)



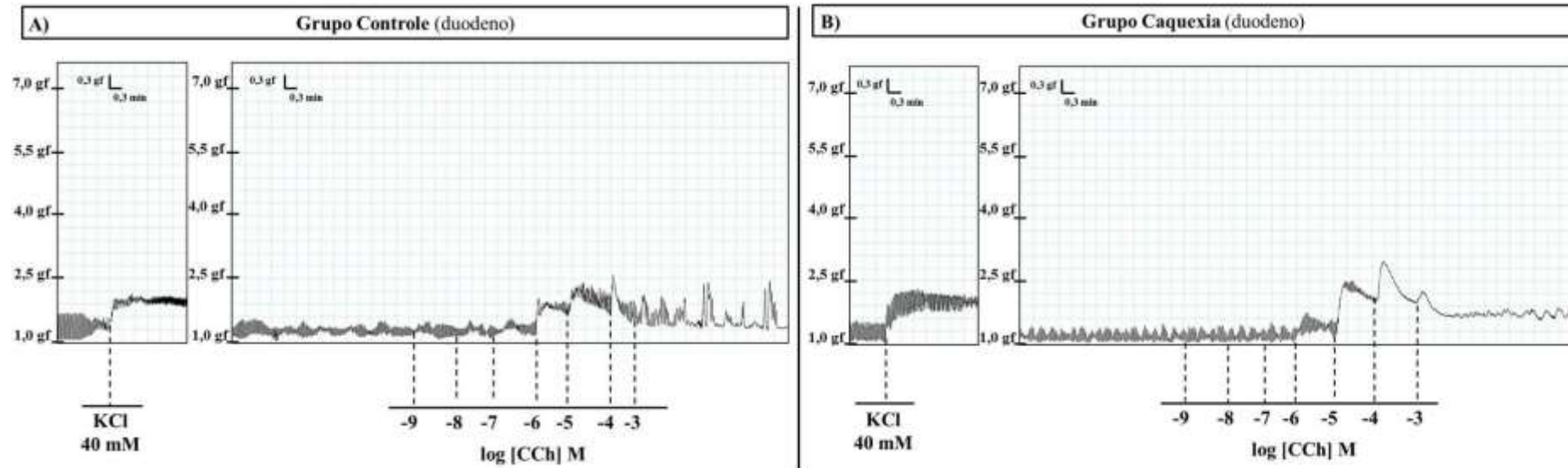
B)



Legenda: Curvas sigmóides de porcentagem de contração de segmentos de duodeno em função de concentrações cumulativas de carbacol (em log), de -9 M a -3 M (em **A**), e Valores de CE50 (em **B**), referentes aos grupos experimentais Controle (n=6) e Caquexia (CQX, n=5). Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m.) (em **A**) e mediana [(percentil 25%) – (percentil 75%)] (em **B**), e analisados estatisticamente por ANOVA two-way, seguido de teste de Tukey (em **A**), e Teste *t-Student* não pareado (em **B**).
Fonte: Própria.

A **Figura 35** apresenta os registros da resposta contrátil de segmentos de duodeno, que relacionam a tensão (em grama-força, gf) em função do estímulo colinérgico cumulativo (CCh -9 M a -3 M, em log), em sucessivos pontos de tempo, para os grupos experimentais: “Controle” e “Caquexia”.

Figura 35 - Registros originais da contratilidade *in vitro* de segmentos de duodeno de ratos com caquexia.

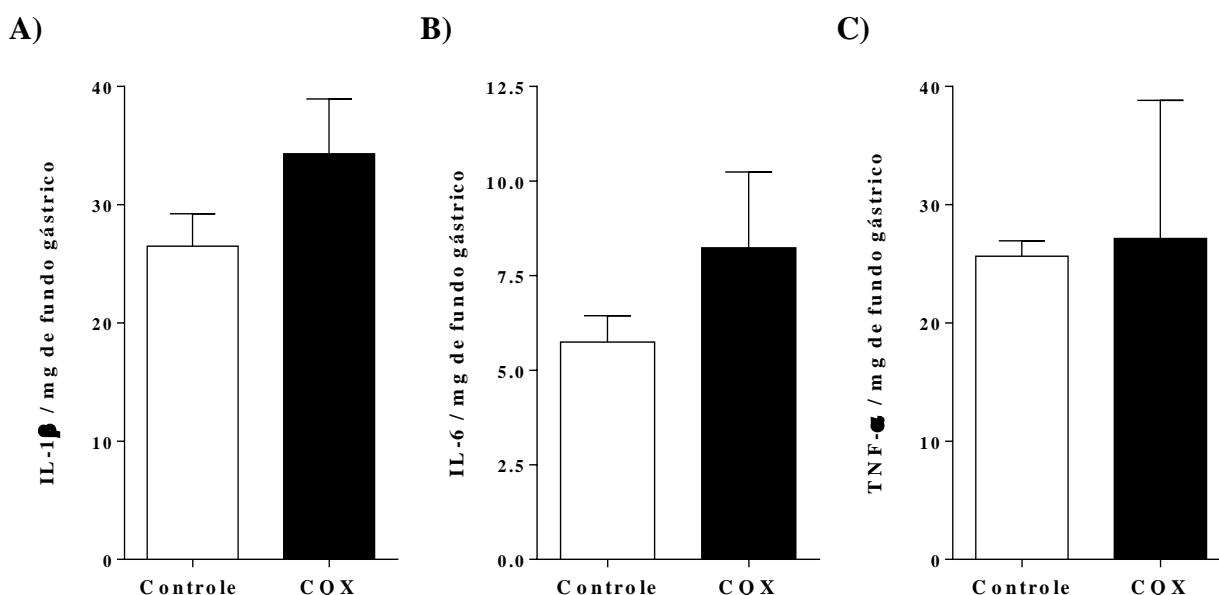


Legenda: Traçados produzidos pela resposta contrátil de segmentos de duodeno, frente ao estímulo colinérgico cumulativo (em log: -9 M a -3 M), referentes aos grupos experimentais Controle (em A) e Caquexia (em B). gf: grama-força. min: minutos. mM: milimolar. M: molar. Escala: 0,3gf: 0,3min. **Fonte:** Própria.

4.3.4 Concentrações de citocinas em fundo gástrico de ratos com caquexia

As **Figuras 36-A, 36-B e 36-C** apresentam os valores médios das concentrações de citocinas em amostras de fundo gástrico para os grupos experimentais. Foi possível observar que, em comparação ao grupo “Controle”, o grupo “Caquexia” (CQX) não apresentou diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$), para: IL-1 β ($26,5 \pm 2,7$ citocina/mg de fundo gástrico vs. $34,3 \pm 4,6$ citocina/mg de fundo gástrico), IL-6 ($5,7 \pm 0,7$ citocina/mg de fundo gástrico vs. $8,2 \pm 2,0$ citocina/mg de fundo gástrico), e TNF- α ($25,6 \pm 1,3$ citocina/mg de fundo gástrico vs. $27,2 \pm 11,7$ citocina/mg de fundo gástrico).

Figura 36 – Concentrações de citocinas em fundo gástrico de ratos com caquexia.



Legenda: Concentração de interleucina 1-beta (IL-1 β , em **A**), interleucina 6 (IL-6, em **B**) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α , em **C**) em amostras de fundo gástrico referentes aos grupos experimentais Controle (n=4) e Caquexia (CQX, n=5). Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m.), e analisados estatisticamente por Teste *t-Student* não pareado (em **A, B e C**). **Fonte:** Própria.

4.4 Participação de receptores β 1-adrenérgicos sobre alterações fisiológicas e gástricas de ratos com caquexia

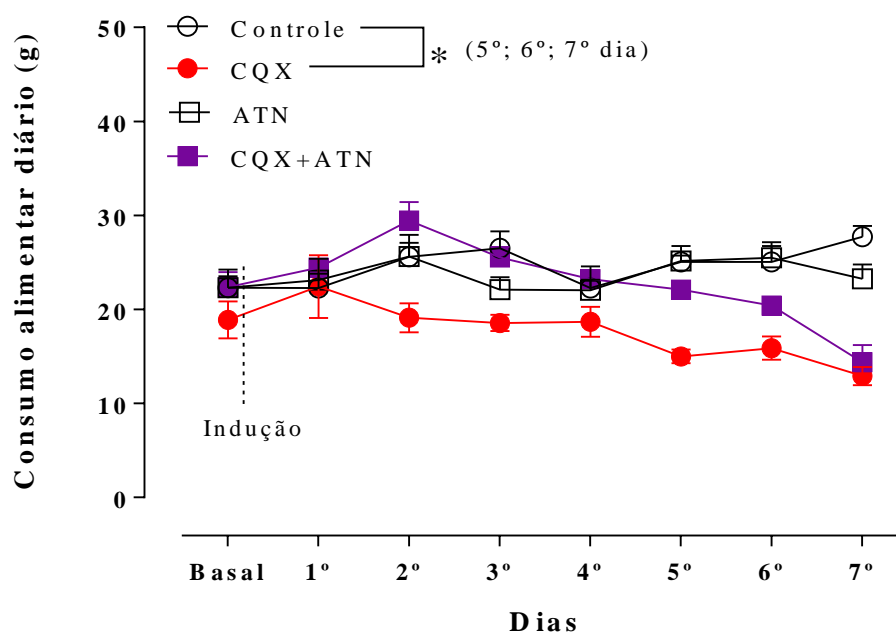
4.4.1 Efeito da administração de atenolol sobre o consumo alimentar de ratos com caquexia induzida

A **Figura 37-A** apresenta o consumo alimentar diário referente aos grupos experimentais. Foi possível observar que, em comparação ao grupo “Caquexia” (CQX), o grupo “Caquexia + Atenolol” (CQX+ATN) não apresentou diferenças estatisticamente ($p>0,05$) significativas no consumo alimentar diário no 5º dia ($15,0 \pm 0,7$ g vs. $22,1 \pm 0,9$ g), 6º dia ($15,9 \pm 1,2$ g vs. $20,4 \pm 0,9$ g) e 7º dia ($12,9 \pm 0,9$ g vs. $14,4 \pm 1,8$ g).

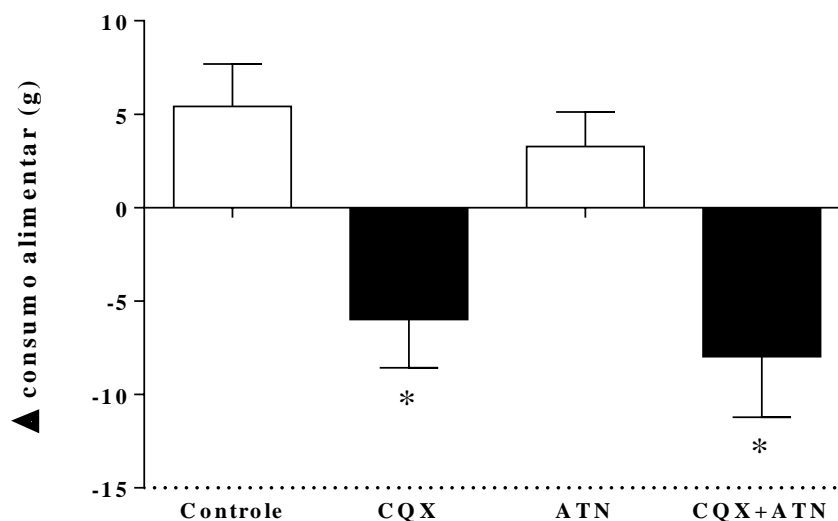
A **Figura 37-B** mostra a variação (Δ) de consumo alimentar para os grupos experimentais. Observou-se que, em comparação ao grupo “Caquexia”, o grupo “Caquexia + Atenolol” não mostrou diferenças estatisticamente ($p>0,05$) significativas na variação de consumo alimentar ($-5,9 \pm 2,6$ g vs. $-7,9 \pm 3,2$ g). Ademais, em comparação ao grupo “Atenolol” (ATN), o grupo “Caquexia + Atenolol” mostrou uma redução estatisticamente significativa ($p<0,05$) na variação de consumo alimentar ($3,3 \pm 1,8$ g vs. $-7,9 \pm 3,2$ g).

Figura 37 – Consumo alimentar de ratos com caquexia induzida, e previamente submetidos às administrações diárias com atenolol.

A)



B)



Legenda: Valores médios de consumo alimentar diário (em **A**), e da variação de consumo alimentar (em **B**) referentes aos grupos experimentais: Controle (n=4), Caquexia (CQX, n=4), Atenolol (ATN, n=7), e Caquexia + Atenolol (CQX+ATN, n=5). Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m.), e analisados estatisticamente por ANOVA two-way seguido de teste de Tukey (em **A**), e ANOVA one-way seguido de teste de Tukey (em **B**). *: $p < 0,05$ (Em **A**: CQX vs. Controle. Em **B**: CQX vs. Controle / CQX+ATN vs. ATN). A linha tracejada (em **A**) representa a indução de caquexia, a qual foi realizada após a coleta dos dados referentes ao consumo basal. **Fonte:** Própria.

4.4.2 Efeito da administração de atenolol sobre a variação de peso corporal e índice de caquexia (IC%) de ratos com caquexia induzida

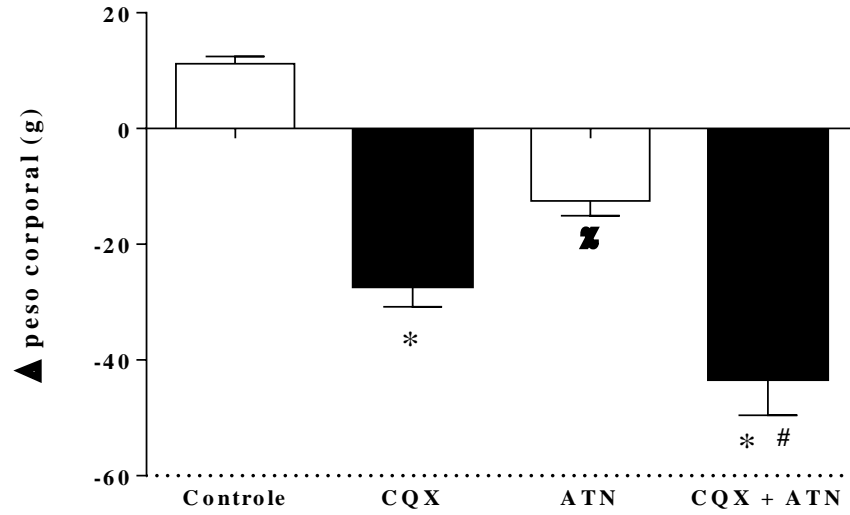
A **Figura 38-A** apresenta os valores de variação no peso corporal para os grupos experimentais. Foi possível observar que, em comparação ao grupo “Caquexia” (CQX), o grupo “Caquexia + Atenolol” (CQX+ATN) apresentou uma diminuição estatisticamente significativa ($p < 0,05$) na variação de peso corporal ($-27,3 \pm 3,5$ g vs. $-43,3 \pm 6,2$ g).

Ademais, em comparação ao grupo “Atenolol” (ATN), o grupo “Caquexia + Atenolol” apresentou uma redução estatisticamente significativa ($p < 0,05$) na variação de peso corporal ($-12,5 \pm 2,5$ g vs. $-43,3 \pm 6,2$ g). Observou-se também que, em comparação ao grupo “Controle”, o grupo “Atenolol” mostrou uma redução significativa ($p < 0,05$) na variação de peso corporal ($11,2 \pm 1,3$ g vs. $-12,5 \pm 2,5$ g).

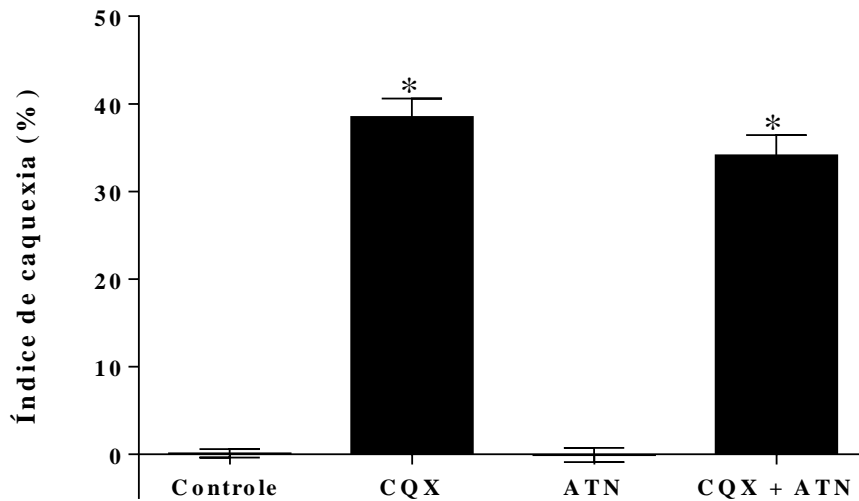
A **Figura 38-B** apresenta os valores de Índice de caquexia (IC%) em função dos grupos experimentais. Observou-se que, em comparação ao grupo “Caquexia”, o grupo “Caquexia + Atenolol” não apresentou diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) em relação ao índice de caquexia ($38,5 \pm 2,1\%$ vs. $34,1 \pm 2,3\%$). Observou-se também que, em comparação ao grupo “Atenolol”, o grupo “Caquexia + Atenolol” mostrou um aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) no índice de caquexia ($-0,1 \pm 0,8\%$ vs. $34,1 \pm 2,3\%$).

Figura 38 – Variação no peso corporal e índice de caquexia de ratos com caquexia induzida, e previamente submetidos às administrações diárias com atenolol.

A)



B)



Legenda: Valores médios da variação de peso corporal (em **A**), e Índice de Caquexia (IC%) (em **B**), referentes aos grupos experimentais Controle (n=9), Caquexia (CQX, n=8), Atenolol (ATN, n=8) e Caquexia + Atenolol (CQX+ATN, n=9). Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m.), e analisados estatisticamente por ANOVA one-way, seguido de teste de Tukey (em **A** e **B**). *: $p < 0,05$ (Em **A** e **B**: CQX vs. Controle / CQX+ATN vs. ATN). χ : $p < 0,05$ (Em **A**: ATN vs. Controle). #: $p < 0,05$ (Em **A**: CQX+ATN vs. CQX).
Fonte: Própria.

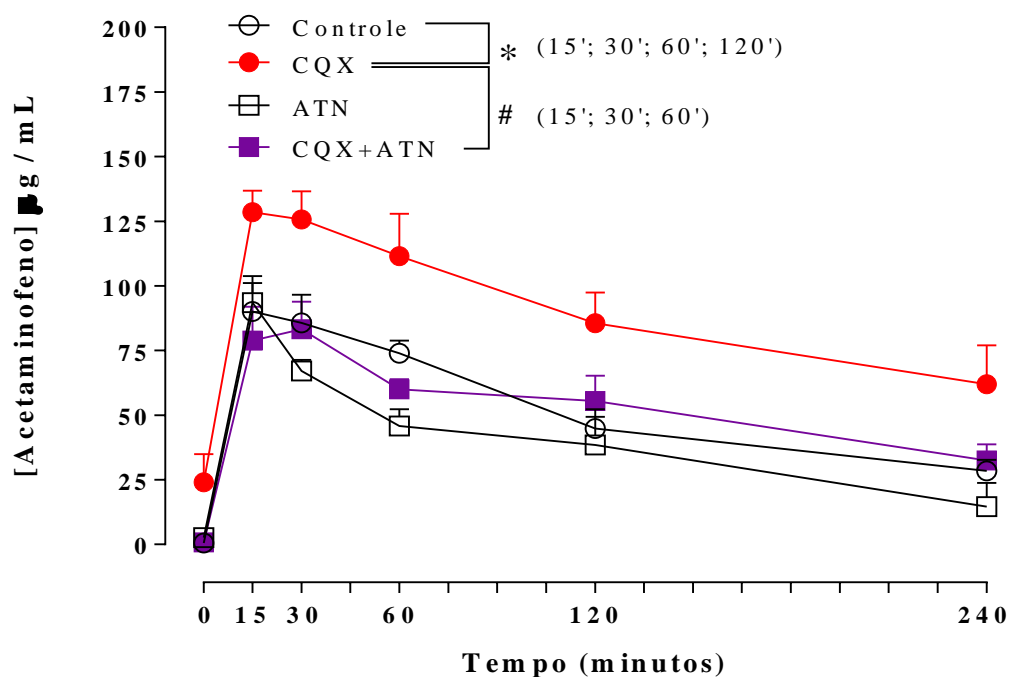
4.4.3 Efeito da administração de atenolol sobre o processo de esvaziamento gástrico *in vivo* de ratos com caquexia induzida

A **Figura 39-A** apresenta as concentrações médias de acetaminofeno, em função dos seis pontos de tempo, para os grupos experimentais. Foi possível observar que, em comparação ao grupo “Caquexia” (CQX), o grupo “Caquexia + Atenolol” (CQX+ATN) apresentou uma redução estatisticamente significativa ($p < 0,05$) nas concentrações de acetaminofeno, nos seguintes pontos de tempo: 15 min. ($128,5 \pm 8,3 \mu\text{g/mL}$ vs. $78,9 \pm 13,0 \mu\text{g/mL}$), 30 min. ($125,7 \pm 10,9 \mu\text{g/mL}$ vs. $83,2 \pm 10,6 \mu\text{g/mL}$), e 60 min. ($111,5 \pm 16,3 \mu\text{g/mL}$ vs. $60,0 \pm 3,8 \mu\text{g/mL}$).

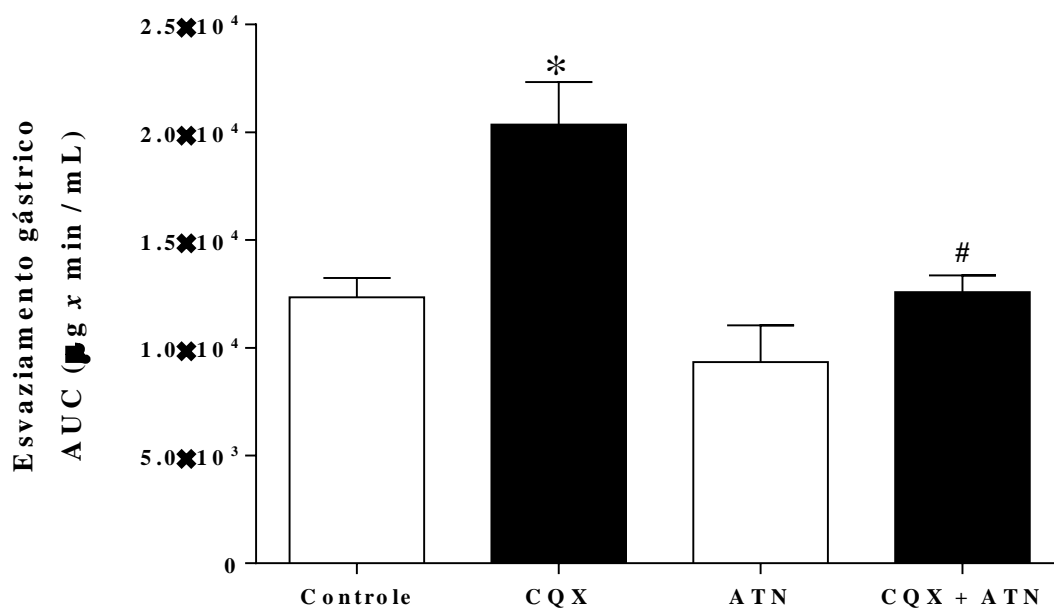
A **Figura 39-B** apresenta os valores médios da área sob a curva (AUC) em função dos grupos experimentais. Foi possível observar que, em comparação ao grupo “Caquexia”, o grupo “Caquexia + Atenolol” mostrou uma redução estatisticamente significativa ($p < 0,05$) na AUC ($20.360,2 \pm 1.970,9 \mu\text{g} \times \text{min/mL}$ vs. $12.579,20 \pm 785,3690 \mu\text{g} \times \text{min/mL}$). Adicionalmente, em comparação ao grupo “Atenolol” (ATN), o grupo “Caquexia + Atenolol” não apresentou diferenças estatisticamente ($p > 0,05$) significativas ($9.333,0 \pm 1.715,3 \mu\text{g} \times \text{min/mL}$ vs. $12.579,2 \pm 785,4 \mu\text{g} \times \text{min/mL}$).

Figura 39 – Perfil de esvaziamento gástrico de ratos com caquexia induzida, e previamente submetidos às administrações diárias com atenolol.

A)



B)



Legenda: Curvas de concentrações de acetaminofeno vs. tempo (em A) e Valores de área sob a curva (AUC) (em B) referentes aos grupos experimentais Controle (n=5), Caquexia (CQX, n=6), Atenolol (ATN, n=5), e Caquexia + Atenolol (CQX+ATN, n=5). Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m.), e analisados estatisticamente por ANOVA two-way (em A), e ANOVA one-way (em B), ambos seguidos de teste de Tukey. *: $p < 0,05$ (Em A e B: CQX vs. Controle). #: $p < 0,05$ (Em A e B: CQX+ATN vs. CQX). **Fonte:** Própria.

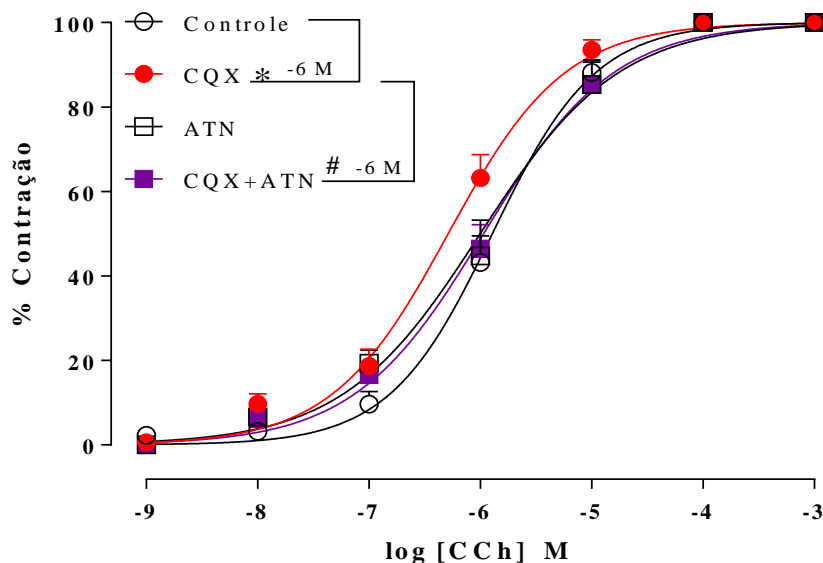
4.4.4 Efeito da administração de atenolol sobre o perfil de contratilidade *in vitro* de tiras isoladas de fundo gástrico de ratos com caquexia induzida

A **Figura 40-A** apresenta as porcentagens médias de contração de tiras isoladas de fundo gástrico, em função de concentrações cumulativas de carbacol, para os grupos experimentais. Foi possível observar que, em comparação ao grupo “Caquexia” (CQX), o grupo “Caquexia + Atenolol” (CQX+ATN) apresentou uma redução estatisticamente significativa ($p < 0,05$) na porcentagem de contração referente à concentração de carbacol (em log) de -6 M ($63,2 \pm 5,5\%$ vs. $46,5 \pm 5,7\%$).

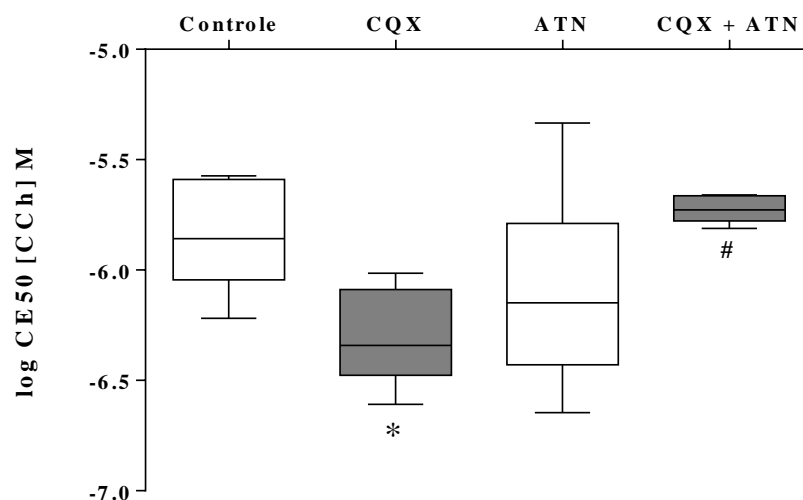
A **Figura 40-B** apresenta os valores medianos das concentrações de carbacol (em log) que ocasionaram metade (50%) da resposta máxima (CE50), para os grupos experimentais. Foi possível observar que, em comparação ao grupo “Caquexia”, o grupo “Caquexia + Atenolol” apresentou uma elevação estatisticamente significativa ($p < 0,05$) na CE50: -6,3 M [(-6,5 M) – (-6,1 M)] vs. -5,7 M [(-5,8 M) – (-5,7 M)].

Figura 40 – Contratilidade de tiras isoladas de fundo gástrico de ratos com caquexia induzida, e administrados previamente com atenolol.

A)



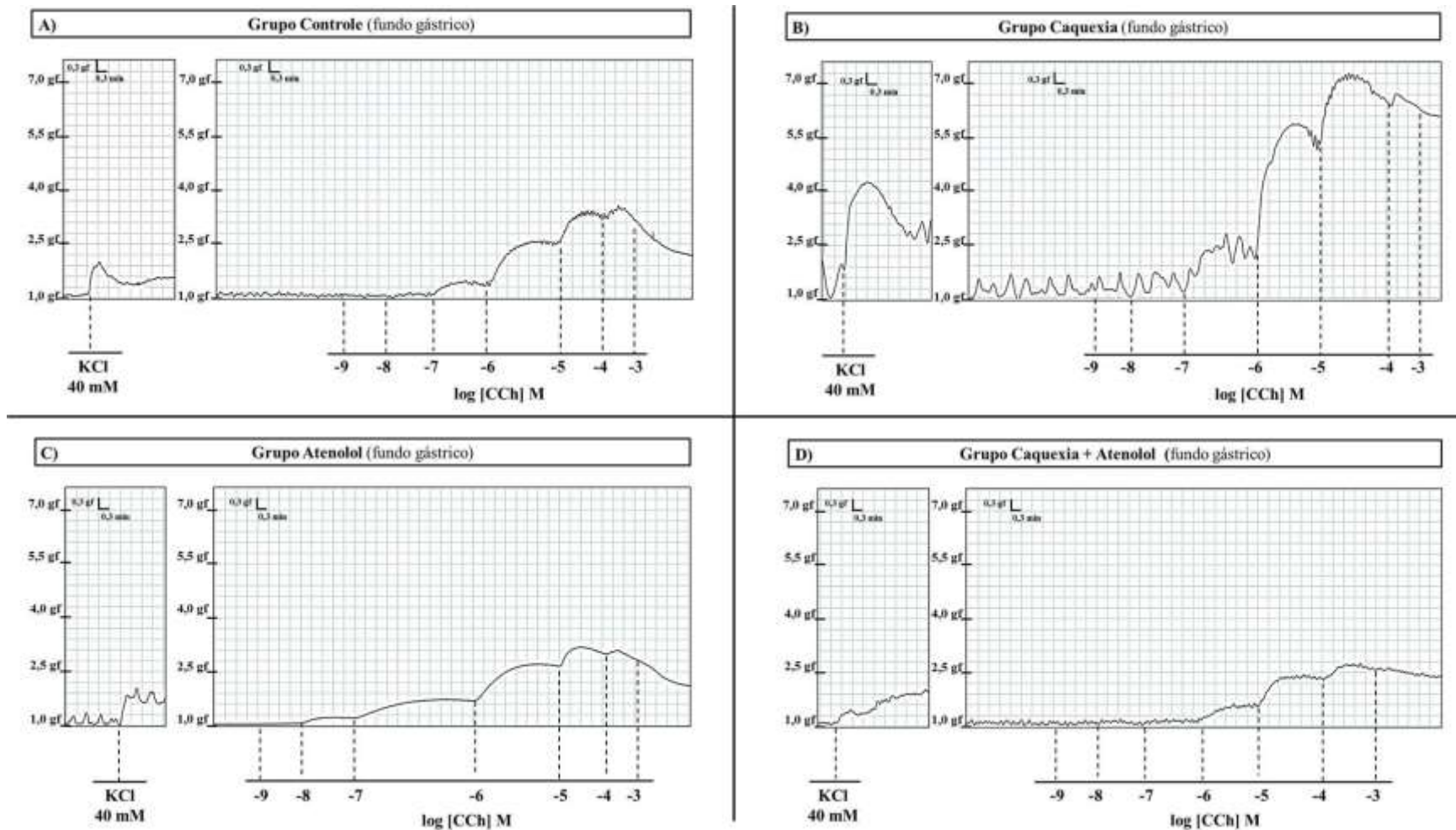
B)



Legenda: Curvas sigmóides de porcentagens de contração de tiras de fundo gástrico em função de concentrações cumulativas de carbacol (em log), de -9 M a -3 M (em A), e Valores da CE50 (em B), referentes aos grupos experimentais Controle (n=6), Caquexia (CQX, n=5), Atenolol (ATN, n=6) e Caquexia + Atenolol (CQX+ATN, n=5). Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m.) (em A) e mediana [(percentil 25%) – (percentil 75%)] (em B), e analisados estatisticamente por ANOVA two-way, seguido de teste de Tukey (em A), e ANOVA one-way, seguido de teste de Tukey (em B). M: molar. *: $p < 0,05$ (Em A e B: CQX vs. Controle). #: $p < 0,05$ (Em A e B: CQX + ATN vs. CQX). **Fonte:** Própria.

A **Figura 41** apresenta os registros da resposta contrátil de tiras de fundo gástrico, que relacionam a tensão (em grama-força, gf) em função do estímulo colinérgico cumulativo (CCh -9M a -3M, em log), em sucessivos pontos de tempo, para os grupos: “Controle” (em A), “Caquexia” (em B); “Atenolol” (em C) e “Caquexia + Atenolol” (em D).

Figura 41 – Registros originais da contratilidade *in vitro* de tiras de fundo gástrico de ratos com caquexia, submetidos às administrações diárias de atenolol.



Legenda: Traçados produzidos pela resposta contrátil de tiras isoladas de fundo gástrico, frente ao estímulo colinérgico cumulativo (em log: -9 M a -3 M), referentes aos grupos experimentais Controle (em **A**), Caquexia (em **B**), Atenolol (em **C**), e Caquexia + Atenolol (em **D**). *gf*: grama-força. *min*: minutos. *mM*: milimolar. *M*: molar. Escala: 0,3gf: 0,3min. **Fonte:** Própria.

4.5 Envolvimento de vias neurais parassimpáticas sobre alterações fisiológicas e gástricas de ratos com caquexia

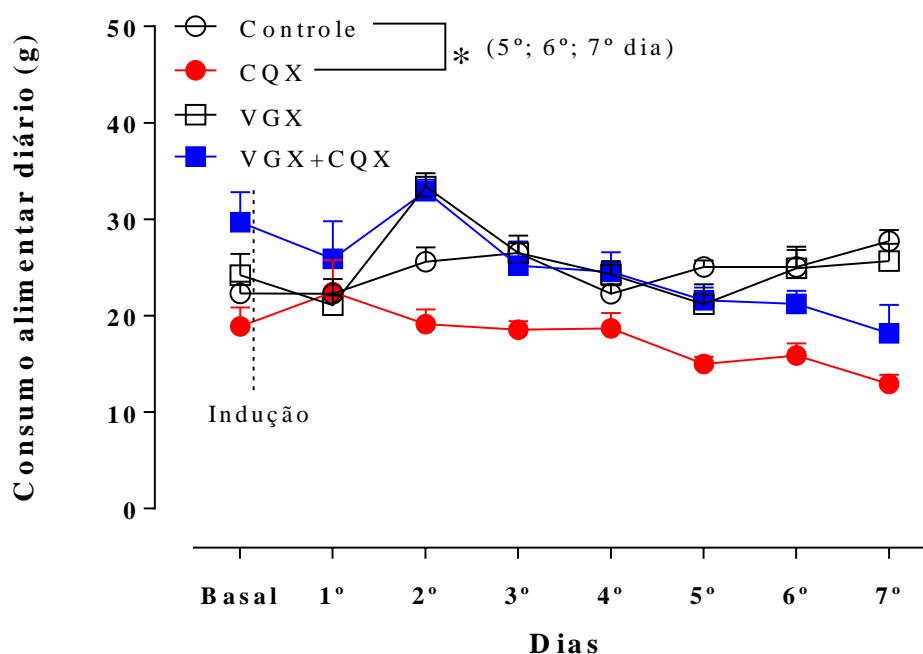
4.5.1 Efeito da vagotomia troncular subdiafragmática sobre o consumo alimentar de ratos com caquexia induzida

A **Figura 42-A** apresenta o consumo alimentar diário referente aos grupos experimentais. Foi possível observar que, em comparação ao grupo “Caquexia” (CQX), o grupo “Vagotomia + Caquexia” (VGX+CQX) não apresentou diferenças estatisticamente significativas ($p>0,05$) na ingestão alimentar no 5º dia ($15,0 \pm 0,7$ g vs. $21,6 \pm 1,3$ g), 6º dia ($15,9 \pm 1,2$ g vs. $21,2 \pm 1,4$ g), e 7º dia ($12,9 \pm 0,9$ g vs. $18,2 \pm 2,9$ g).

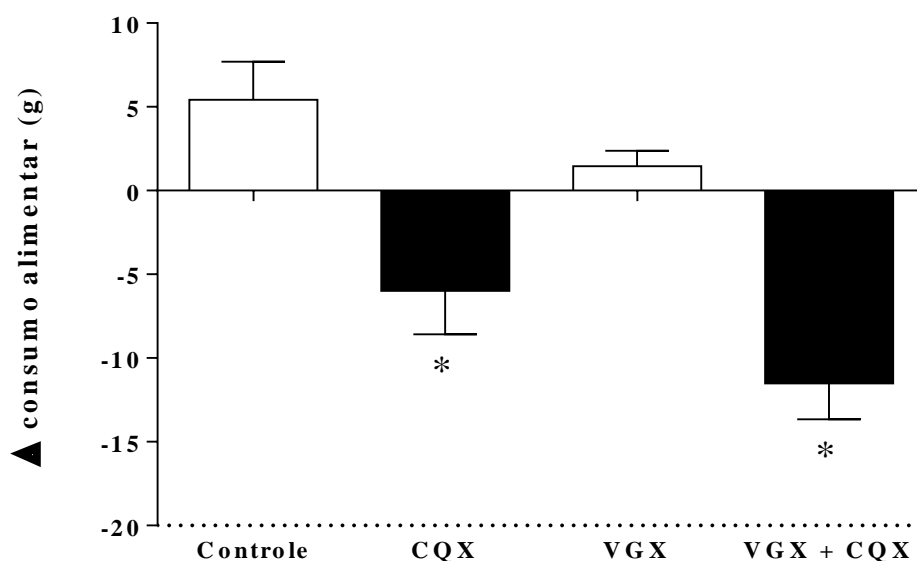
A **Figura 42-B** mostra a variação (Δ) de consumo alimentar para os grupos experimentais. Observou-se que, em comparação ao grupo “Caquexia”, o grupo “Vagotomia + Caquexia” não apresentou diferenças estatisticamente ($p>0,05$) significativas na variação de consumo alimentar ($-5,9 \pm 2,6$ g vs. $\pm -11,5 \pm 2,1$ g). Ademais, em comparação ao grupo “Vagotomia” (VGX), o grupo “Vagotomia + Caquexia” mostrou uma redução significativa ($p<0,05$) na variação de consumo alimentar ($1,5 \pm 0,9$ g vs. $-11,5 \pm 2,1$ g).

Figura 42 – Consumo alimentar de ratos com caquexia induzida, e previamente submetidos à vagotomia troncular subdiafragmática.

A)



B)



Legenda: Valores médios de consumo alimentar diário (em **A**), e da variação de consumo alimentar (em **B**) referentes aos grupos experimentais: Controle (n=4), Caquexia (CQX, n=4), Vagotomia (VGX, n=7), e Vagotomia + Caquexia (VGX+CQX, n=5). Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m.), e analisados estatisticamente por ANOVA two-way seguido de teste de Tukey (em **A**), e ANOVA one-way seguido de teste de Tukey (em **B**). *: $p < 0,05$ (Em **A**: CQX vs. Controle. Em **B**: CQX vs. Controle / VGX+CQX vs. VGX). A linha tracejada (em **A**) representa a indução de caquexia, a qual foi realizada após a coleta dos dados referentes ao consumo basal. **Fonte:** Própria.

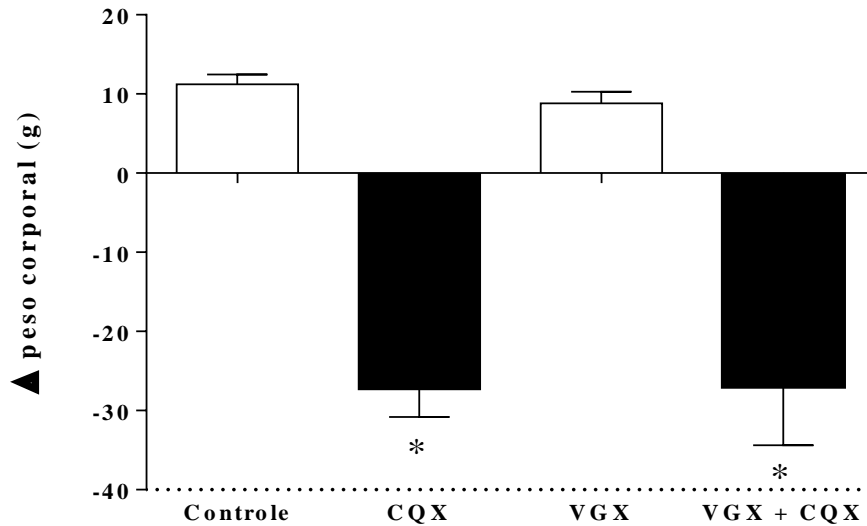
4.5.2 Efeito da vagotomia subdiafragmática total sobre a variação de peso corporal e índice de caquexia (IC %) de ratos com caquexia induzida

A **Figura 43-A** apresenta os valores da variação de peso corporal em função dos grupos experimentais. Foi possível observar que, em comparação ao grupo “Caquexia” (CQX), o grupo “Vagotomia + Caquexia” (VGX+CQX) não mostrou uma variação estatisticamente significativa ($p > 0,05$) na variação de peso corporal ($-27,3 \pm 3,5$ g vs. $-27,0 \pm 7,4$ g). Ademais, em comparação ao grupo “Vagotomia” (VGX), o grupo “Vagotomia + Caquexia” apresentou uma diminuição estatisticamente significativa ($p < 0,05$) na variação de peso corporal ($8,8 \pm 1,4$ g vs. $-27,0 \pm 7,4$ g).

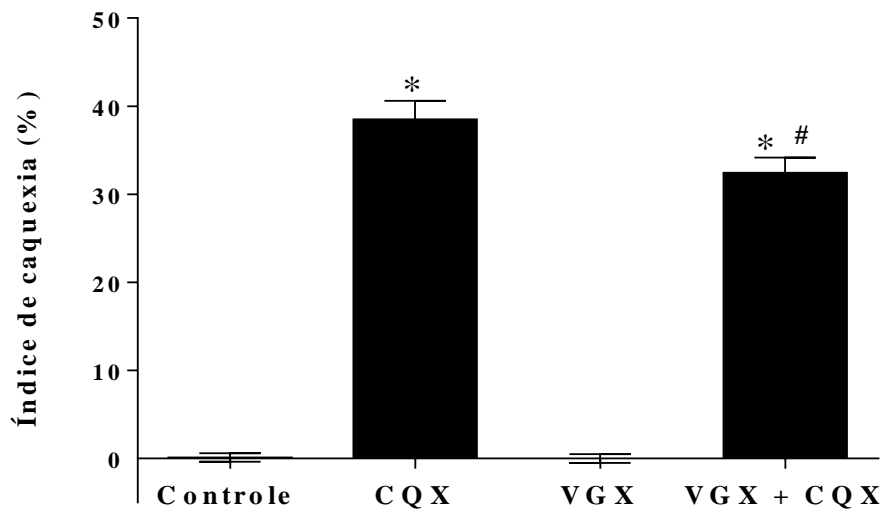
A **Figura 43-B** apresenta os valores de Índice de caquexia (IC%) para os grupos experimentais. Foi possível observar que, em comparação ao grupo “Caquexia”, o grupo “Vagotomia + Caquexia” apresentou uma redução estatisticamente significativa ($p < 0,05$) no índice de caquexia ($38,5 \pm 2,1\%$ vs. $32,4 \pm 1,7\%$). Observou-se também que, em comparação ao grupo “Vagotomia”, o grupo “Vagotomia + Caquexia” mostrou um aumento estatisticamente significativo no índice de caquexia ($0,1 \pm 0,5\%$ vs. $32,4 \pm 1,7\%$).

Figura 43 – Variação do peso corporal e índice de caquexia de ratos com caquexia induzida, e previamente submetidos à vagotomia troncular subdiafragmática.

A)



B)



Legenda: Valores médios da variação de peso corporal (em **A**), e do Índice de Caquexia (IC%) (em **B**) referentes aos grupos experimentais Controle (n=9), Caquexia (CQX, n=8), Vagotomia (VGX, n=6) e Vagotomia + Caquexia (VGX+CQX, n=9). Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m.), e analisados estatisticamente por ANOVA one-way, seguido de teste de Tukey (em **A** e **B**). g: gramas. *: $p < 0,05$ (Em **A** e **B**: CQX vs. Controle / VGX+CQX vs. VGX). #: $p < 0,05$ (Em **B**: VGX+CQX vs. CQX).
Fonte: Própria

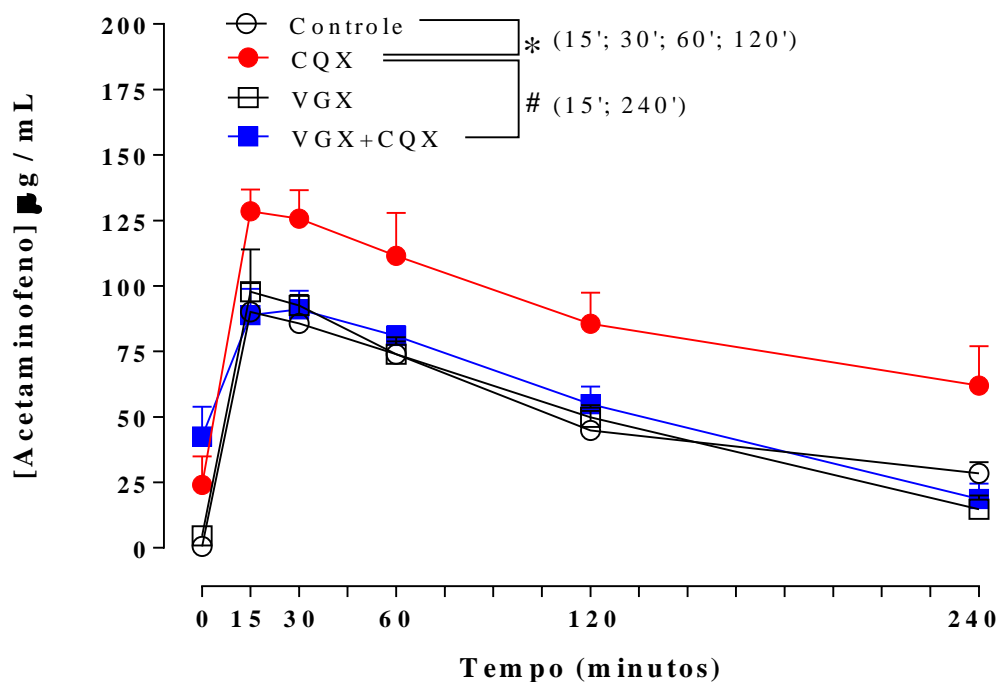
4.5.3 Efeito da vagotomia troncular subdiafragmática sobre o processo de esvaziamento gástrico *in vivo* de ratos com caquexia induzida

A **Figura 44-A** apresenta as concentrações médias de acetaminofeno, em função dos seis pontos de tempo, obtidas para os grupos experimentais. Foi possível observar que, em comparação ao grupo “Caquexia” (CQX), o grupo “Vagotomia + Caquexia” (VGX+CQX) apresentou uma redução estatisticamente significativa ($p < 0,05$) nas concentrações de acetaminofeno, nos seguintes pontos de tempo: 15 min. ($128,5 \pm 8,3 \mu\text{g/mL}$ vs. $88,9 \pm 9,9 \mu\text{g/mL}$), e 240 min. ($61,9 \pm 15,0 \mu\text{g/mL}$ vs. $18,6 \pm 5,8 \mu\text{g/mL}$).

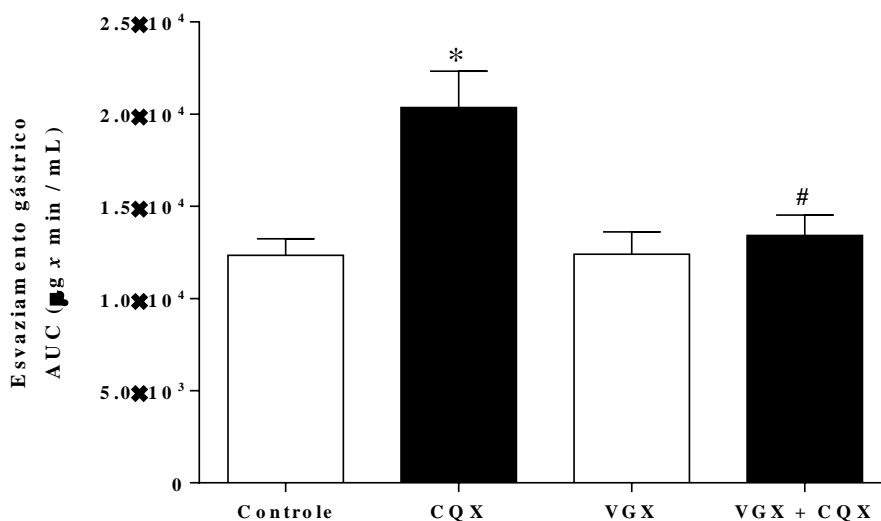
A **Figura 44-B** apresenta os valores médios da área sob a curva (AUC) em função dos grupos experimentais. Foi possível observar que, em comparação ao grupo “Caquexia”, o grupo “Vagotomia + Caquexia” mostrou uma diminuição estatisticamente significativa ($p < 0,05$) da AUC ($20.360,2 \pm 1.970,9 \mu\text{g} \times \text{min/mL}$ vs. $13.414,0 \pm 1.112,9 \mu\text{g} \times \text{min/mL}$). Adicionalmente, em comparação ao grupo “Vagotomia” (VGX), o grupo “Vagotomia + Caquexia” não apresentou diferenças estatisticamente ($p > 0,05$) significativas ($12.405,7 \pm 1.211,7 \mu\text{g} \times \text{min/mL}$ vs. $13.414,0 \pm 1.112,9 \mu\text{g} \times \text{min/mL}$).

Figura 44 – Perfil de esvaziamento gástrico de ratos com caquexia induzida, e submetidos previamente à vagotomia troncular subdiafragmática.

A)



B)



Legenda: Curvas de concentrações de acetaminofeno vs. tempo (em A) e Valores de área sob a curva (AUC) (em B) para os grupos Controle (n=5), Caquexia (CQX, n=6), Vagotomia (VGX, n=4), e Vagotomia+Caquexia (VGX+CQX, n=5). Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m.), e analisados estatisticamente por ANOVA two-way (em A), e ANOVA one-way (em B), ambos seguidos de teste de Tukey. *: $p < 0,05$ (Em A e B: CQX vs. Controle). #: $p < 0,05$ (Em A e B: VGX+CQX vs. CQX). **Fonte:** Própria.

4.5.4 Efeito da vagotomia troncular subdiafragmática sobre o perfil de contratilidade *in vitro* de tiras isoladas de fundo gástrico de ratos com caquexia induzida

A **Figura 45-A** apresenta as porcentagens de contração de tiras de fundo gástrico, em função de concentrações cumulativas de carbacol, para os grupos experimentais. Observou-se que, em comparação ao grupo “Caquexia (CQX)”, o grupo “Vagotomia + Caquexia” (VGX+CQX) apresentou uma redução significativa ($p < 0,05$) na porcentagem de contração referente à concentração de carbacol (em log) de -6 M ($63,2 \pm 5,5\%$ vs. $31,2 \pm 4,7\%$).

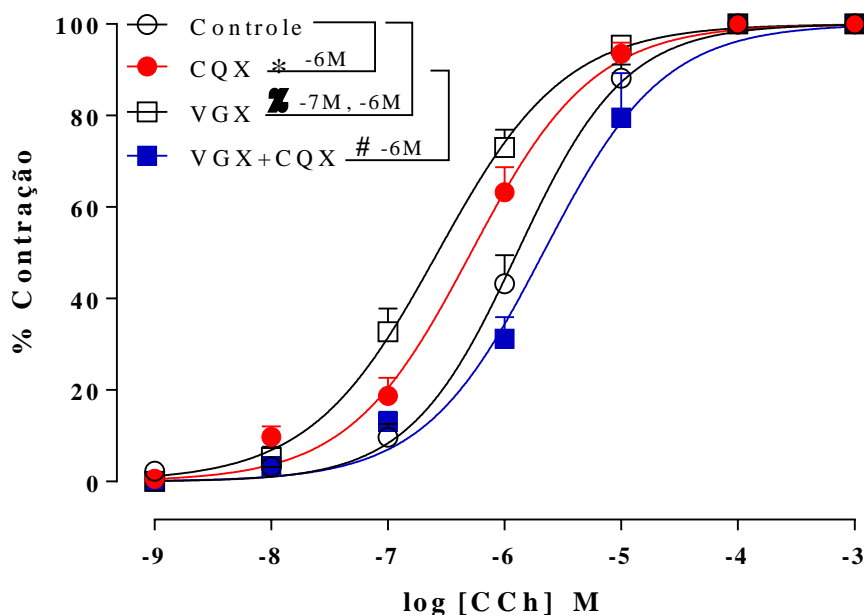
Observou-se também que, em comparação ao grupo “Controle”, o grupo “Vagotomia” (VGX) apresentou um aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) na porcentagem de contração referente às concentrações de carbacol (em log) de -7 M ($9,6 \pm 2,9\%$ vs. $32,7 \pm 5,1\%$) e -6 M ($43,2 \pm 6,3\%$ vs. $72,9 \pm 3,9\%$).

A **Figura 45-B** mostra os valores (em log) das concentrações de carbacol que produziram metade da resposta máxima (CE50). Observou-se que, em comparação ao grupo “Caquexia”, o grupo “Vagotomia + Caquexia” apresentou um aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) da CE50: -6,3 M [(-6,5 M) – (-6,1 M)] vs. -5,7 M [(-5,8 M) – (-5,3 M)].

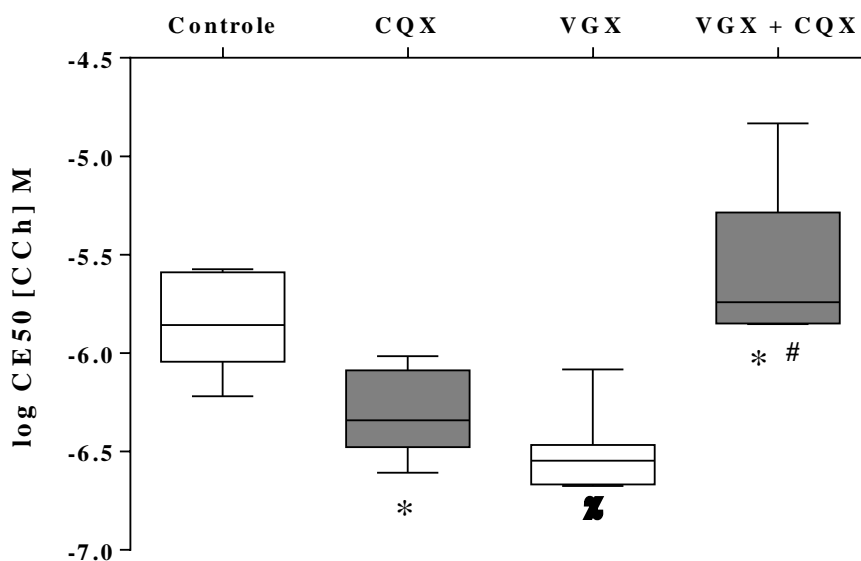
Observou-se que, comparado ao grupo “Controle”, o grupo “Vagotomia” apresentou uma redução significativa ($p < 0,05$) na CE50: -5,8 M [(-6,0 M) – (-5,6 M)] vs. -6,5 M [(-6,7 M) – (-6,5 M)]. Comparado ao grupo “Vagotomia” o grupo “Vagotomia + Caquexia” mostrou um aumento ($p < 0,05$) na CE50: -6,5 M [(-6,7 M) – (-6,5 M)] vs. -5,7 M [(-5,8 M) – (-5,3 M)].

Figura 45 – Contratilidade de tiras isoladas de fundo gástrico de ratos com caquexia induzida, e submetidos previamente à vagotomia subdiafragmática.

A)



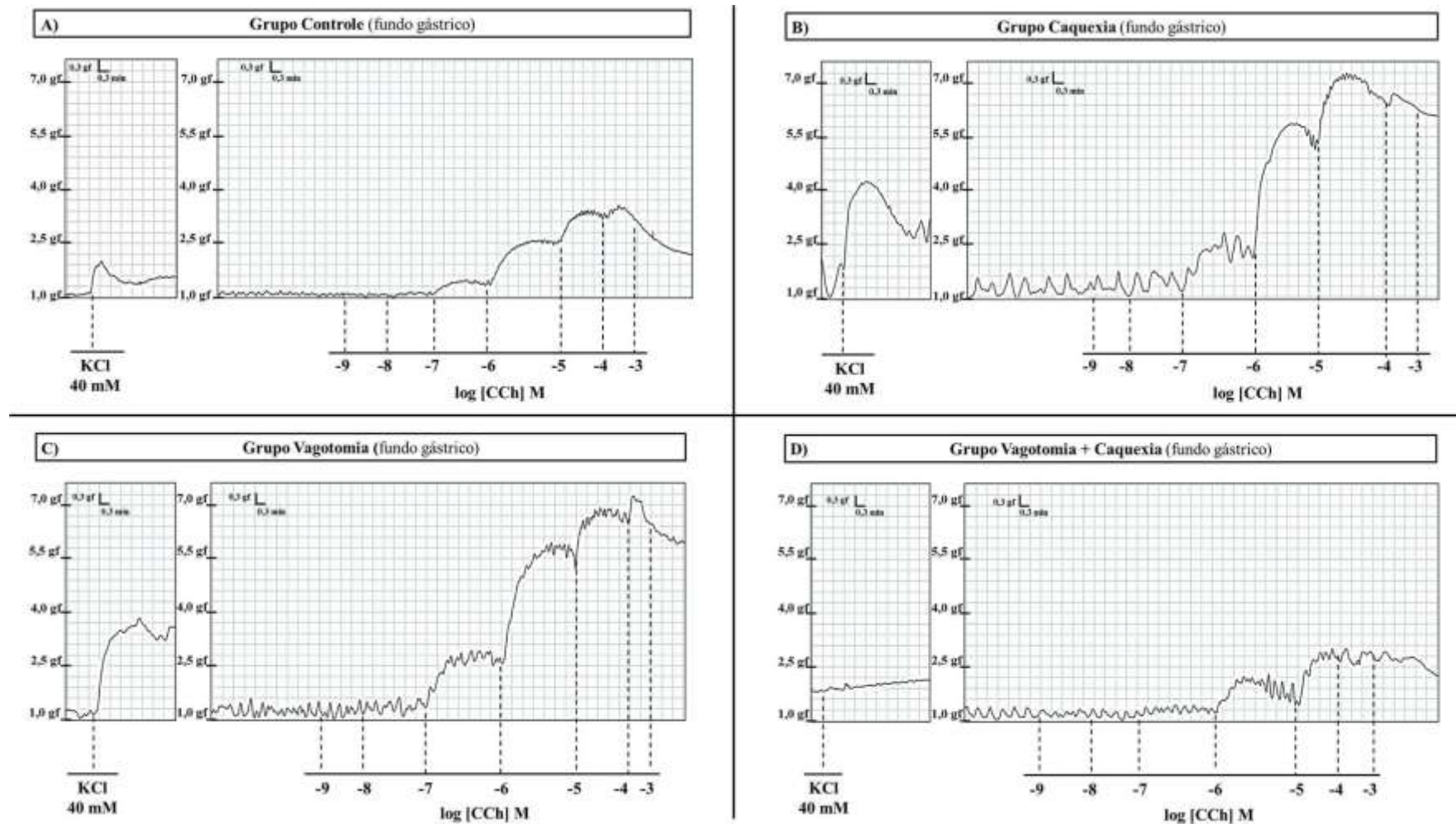
B)



Legenda: Curvas sigmóides de porcentagens de contração de tiras de fundo gástrico em função de concentrações cumulativas de carbachol (em log), de -9 M a -3 M (em A), e Valores da CE50 (em B), referentes aos grupos Controle (n=6), Caquexia (CQX, n=5), Vagotomia (VGX, n=7) e Vagotomia + Caquexia (VGX + CQX, n=5). Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m.) (em A) e mediana [(percentil 25%) – (percentil 75%)] (em B), e analisados estatisticamente por ANOVA two-way, seguido de teste de Tukey (em A), e ANOVA one-way, seguido de teste de Tukey (em B). M: molar. *: $p < 0,05$ (Em A: CQX vs. Controle. Em B: CQX vs. Controle / VGX+CQX vs. VGX). χ : $p < 0,05$ (Em A e B: VGX vs. Controle). #: $p < 0,05$ (Em A e B: VGX+CQX vs. CQX). **Fonte:** Própria.

A **Figura 46** apresenta os registros da resposta contrátil, em grama-força (gf), de tiras isoladas de fundo gástrico, em função do estímulo colinérgico cumulativo (CCh -9 M a -3 M, em log), em sucessivos pontos de tempo, para os grupos experimentais.

Figura 46 – Registros originais da contratilidade *in vitro* de tiras isoladas de fundo gástrico de ratos com caquexia induzida, e submetidos previamente à vagotomia subdiafragmática.



Legenda: Traçados, produzidos pela contratilidade de tiras isoladas de fundo gástrico frente ao estímulo colinérgico cumulativo, referentes aos grupos experimentais Controle (em **A**), Caquexia (em **B**), Vagotomia (em **C**) e Vagotomia + Caquexia (em **D**). *gf*: grama-força. *min*: minutos. *mM*: milimolar. *M*: molar. Escala: 0,3gf: 0,3min. **Fonte:** Própria.

4.6 Papel das vias endocanabinoides sobre alterações fisiológicas e gástricas de ratos com caquexia

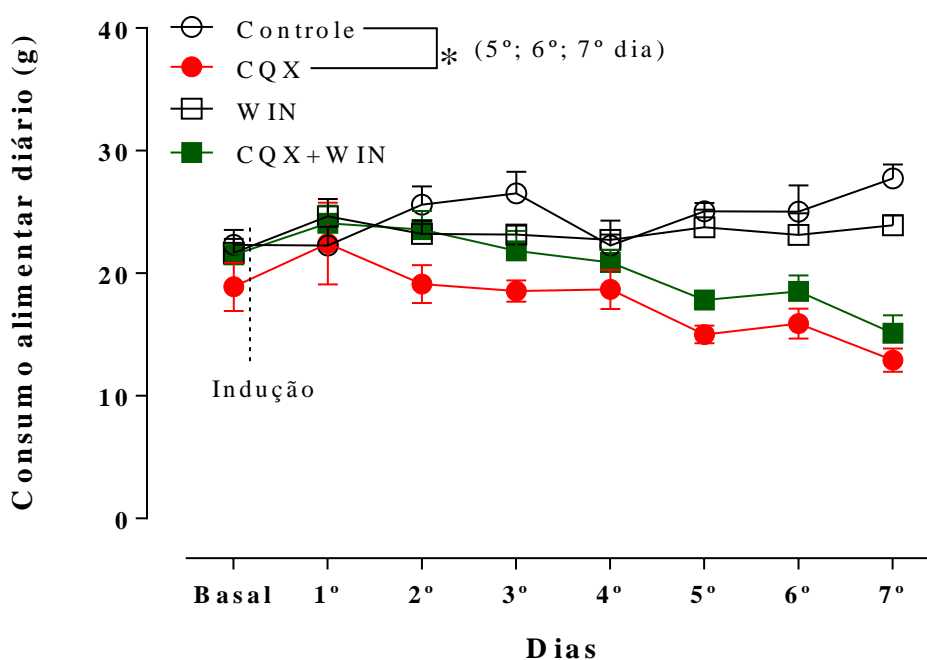
4.6.1 Efeito da administração de win 55,212-2 sobre o consumo alimentar de ratos com caquexia induzida

A **Figura 47-A** apresenta o consumo alimentar diário referente aos grupos experimentais. Foi possível observar que, em comparação ao grupo “Caquexia” (CQX), o grupo “Caquexia + Win 55,212-2” (CQX+WIN) não mostrou diferenças estatísticas significativas ($p > 0,05$) na ingestão alimentar, no 5º dia ($15,0 \pm 0,7$ g vs. $17,8 \pm 0,6$ g), 6º dia ($15,9 \pm 1,2$ g vs. $18,5 \pm 1,3$ g), e 7º dia ($12,9 \pm 0,9$ g vs. $15,1 \pm 1,4$ g).

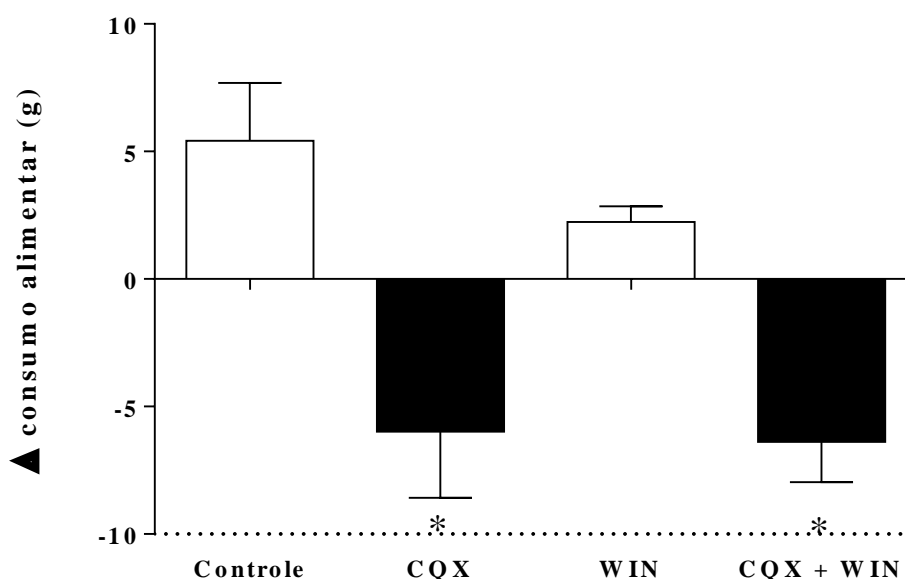
A **Figura 47-B** apresenta a variação (Δ) no consumo alimentar para os grupos experimentais. Observou-se que, em comparação ao grupo “Caquexia”, o grupo “Caquexia + Win 55,212-2” não mostrou diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) quanto à variação no consumo alimentar ($-5,9 \pm 2,6$ g vs. $-6,4 \pm 1,6$ g). Ademais, em comparação ao grupo “Win 55,212-2” (WIN), o grupo “Caquexia + Win 55,212-2” apresentou uma redução significativa ($p < 0,05$) na variação de consumo alimentar ($2,2 \pm 0,6$ g vs. $-6,4 \pm 1,6$ g).

Figura 47 – Consumo alimentar de ratos com caquexia induzida, e previamente submetidos às administrações diárias com win 55,212-2.

A)



B)



Legenda: Valores médios de consumo alimentar diário (em **A**), e da variação de consumo alimentar (em **B**) referentes aos grupos experimentais: Controle (n=4), Caquexia (CQX, n=4), Win 55,212-2 (WIN, n=7), e Caquexia + Win 55,212-2 (CQX+WIN, n=7). Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m.), e analisados estatisticamente por ANOVA two-way seguido de teste de Tukey (em **A**), e ANOVA one-way seguido de teste de Tukey (em **B**). *: $p < 0,05$ (Em **A**: CQX vs. Controle. Em **B**: CQX vs. Controle / CQX+WIN vs. WIN). A linha tracejada (em **A**) representa a indução de caquexia, a qual foi realizada após a coleta dos dados referentes ao consumo basal. **Fonte:** Própria.

4.6.2 Efeito da administração de win 55,212-2 sobre a variação de peso corporal de ratos com caquexia induzida

A **Figura 48-A** apresenta os valores da variação de peso corporal em função dos grupos experimentais. Observou-se que, em comparação ao grupo “Caquexia” (CQX), o grupo “Caquexia + Win 55,212-2” (CQX+WIN) não apresentou diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) na variação de peso corporal ($-27,3 \pm 3,5$ g vs. $-36,6 \pm 4,9$ g).

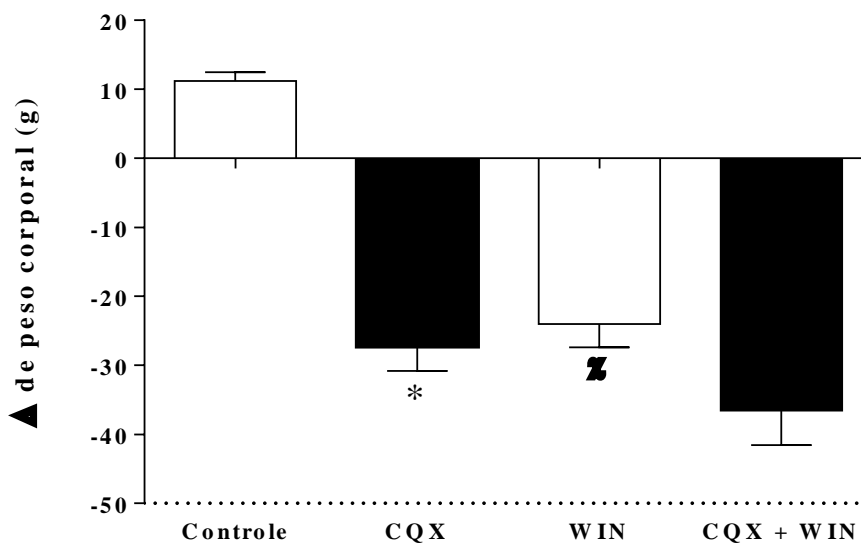
Ademais, em comparação ao grupo “Win 55,212-2”, o grupo “Caquexia + Win 55,212-2” não mostrou diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) na variação de peso corporal ($-24,0 \pm 3,4$ g vs. $-36,6 \pm 4,9$ g). Observou-se também que, em comparação ao grupo “Controle”, o grupo “Win 55,212-2” (WIN) mostrou uma variação negativa estatisticamente significativa ($p < 0,05$) no peso corporal ($11,2 \pm 1,3$ g vs. $-24,0 \pm 3,4$ g).

A **Figura 48-B** apresenta os valores de Índice de caquexia (IC%) para os grupos experimentais. Observou-se que, em comparação ao grupo “Caquexia” (CQX), o grupo “Caquexia + Win 55,212-2” (CQX+WIN) mostrou uma redução significativa ($p < 0,05$) no índice de caquexia ($38,5 \pm 2,1\%$ vs. $25,8 \pm 2,7\%$).

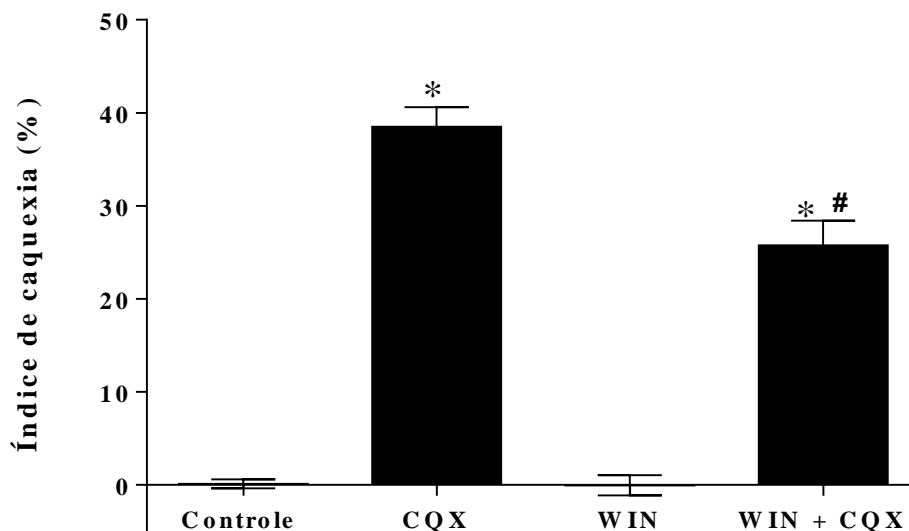
Observou-se também que, em comparação ao grupo “Win 55,212-2”, o grupo “Caquexia + Win 55,212-2” mostrou um aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) no índice de caquexia ($-0,1 \pm 1,1 \%$ vs. $25,8 \pm 2,7 \%$).

Figura 48 – Variação do peso corporal e índice de caquexia de ratos com caquexia induzida, e previamente submetidos às administrações diárias com win 55,212-2.

A)



B)



Legenda: Valores médios da variação de peso corporal (em A), e do Índice de Caquexia (IC%) (em B) referentes aos grupos experimentais Controle (n=9), Caquexia (CQX, n=8), Win 55,212-2 (WIN, n=7) e Caquexia + Win 55,212-2 (CQX+WIN, n=7). Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m.), e analisados estatisticamente por ANOVA one-way, seguido de teste de Tukey (em A e B). g: gramas. *: $p < 0,05$ (Em A: CQX vs. Controle. Em B: CQX vs. Controle / CQX+WIN vs. WIN). χ : $p < 0,05$ (Em A: WIN vs. Controle). #: $p < 0,05$ (Em B: CQX+WIN vs. CQX). **Fonte:** Própria.

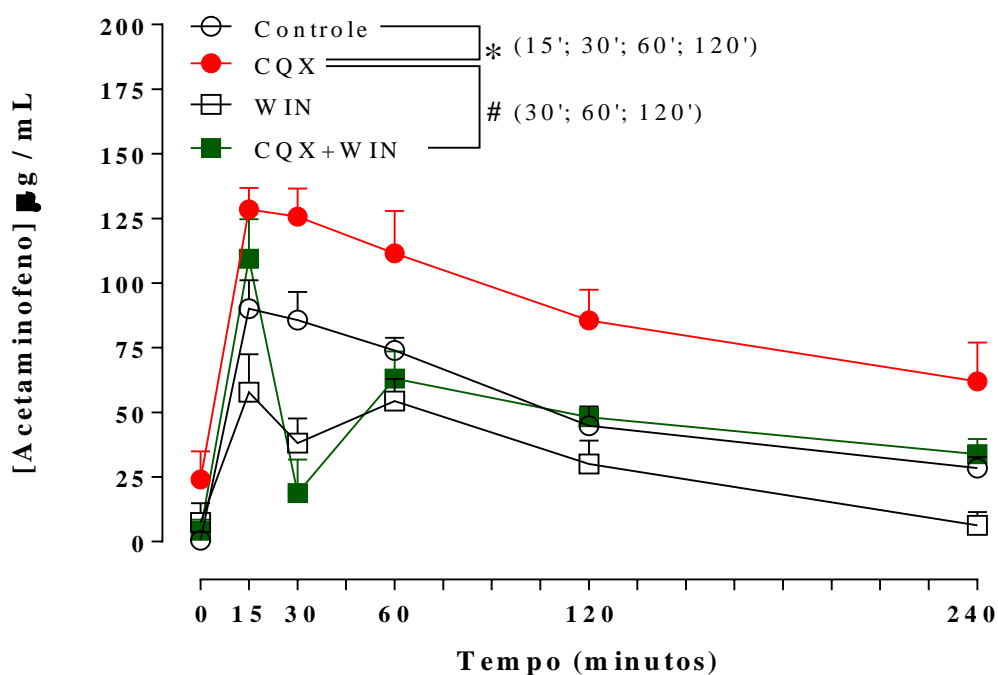
4.6.3 Efeito da administração de win 55,212-2 sobre o processo de esvaziamento gástrico *in vivo* de ratos com caquexia induzida.

A **Figura 49-A** apresenta as concentrações médias de acetaminofeno, em função dos seis pontos de tempo, para os grupos experimentais. Foi possível observar que, em comparação ao grupo “Caquexia” (CQX), o grupo “Caquexia + Win 55,212-2” (CQX+WIIIN) apresentou uma diminuição estatisticamente significativa ($p < 0,05$) nas concentrações de acetaminofeno nos seguintes pontos de tempo: 30 min. ($125,7 \pm 10,9 \mu\text{g/mL}$ vs. $18,8 \pm 13,0 \mu\text{g/mL}$), 60 min. ($111,5 \pm 16,3 \mu\text{g/mL}$ vs. $63,1 \pm 10,4 \mu\text{g/mL}$), e 120 min. ($85,5 \pm 11,9 \mu\text{g/mL}$ vs. $48,1 \pm 3,4 \mu\text{g/mL}$).

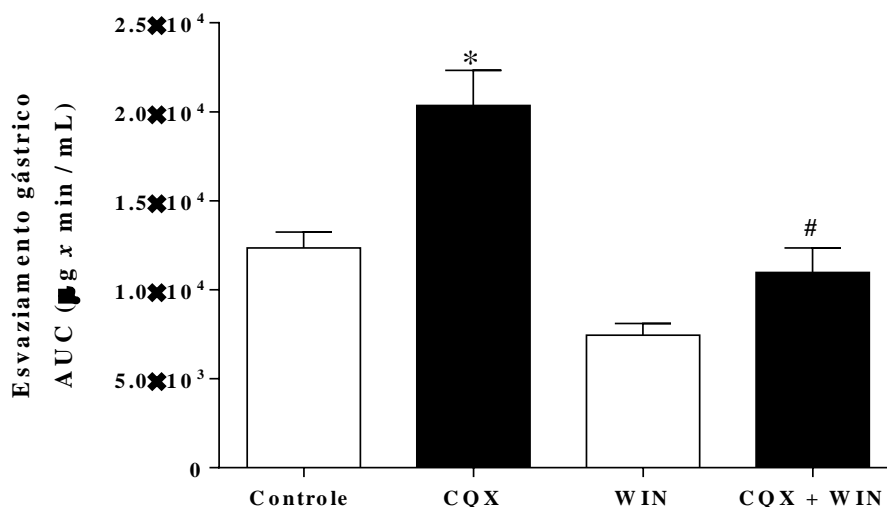
A **Figura 49-B** apresenta os valores médios da área sob a curva (AUC) em função dos grupos experimentais. Foi possível observar que, em comparação ao grupo “Caquexia”, o grupo “Caquexia + Win 55,212-2” apresentou uma diminuição estatisticamente significativa ($p < 0,05$) na AUC ($20.360,2 \pm 1.970,9 \mu\text{g} \times \text{min/mL}$ vs. $10.965,4 \pm 1.392,3 \mu\text{g} \times \text{min/mL}$). Adicionalmente, em comparação ao grupo “Win 55,212-2” (WIN), o grupo “Caquexia + Win 55,212-2” (CQX+WIN) não apresentou diferenças estatisticamente ($p > 0,05$) significativas ($7.454,8 \pm 646,6 \mu\text{g} \times \text{min/mL}$ vs. $10.965,4 \pm 1.392,3 \mu\text{g} \times \text{min/mL}$).

Figura 49 – Perfil de esvaziamento gástrico de ratos com caquexia induzida, e previamente submetidos às administrações diárias com win 55,212-2.

A)



B)



Legenda: Curvas de concentrações de acetaminofeno vs. tempo (em A) e Valores de AUC (em B) referentes aos grupos Controle (n=5), Caquexia (CQX, n=6), Win 55,212-2 (WIN, n=5) e Caquexia + Win 55,212-2 (CQX+WIN, n=5). Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m.), e analisados estatisticamente por ANOVA two-way (em A), e ANOVA one-way (em B), ambos seguidos de teste de Tukey. *: $p < 0,05$ (Em A e B: CQX vs. Controle). #: $p < 0,05$ (Em A e B: CQX+WIN vs. CQX). **Fonte:** Própria.

4.6.4 Efeito da administração de win 55,212-2 sobre o perfil de contratilidade *in vitro* de tiras isoladas de fundo gástrico de ratos com caquexia induzida.

A **Figura 50-A** apresenta as curvas das porcentagens médias de contração de tiras de fundo gástrico, em função de concentrações cumulativas de carbacol. Observou-se que, em comparação ao grupo “Caquexia” (CQX), o grupo “Caquexia + Win 55,212-2” (CQX+WIN) apresentou uma redução estatisticamente significativa ($p < 0,05$) na porcentagem de contração para a concentração de carbacol (em log) de -6 M ($63,2 \pm 5,5\%$ vs. $38,2 \pm 3,9\%$).

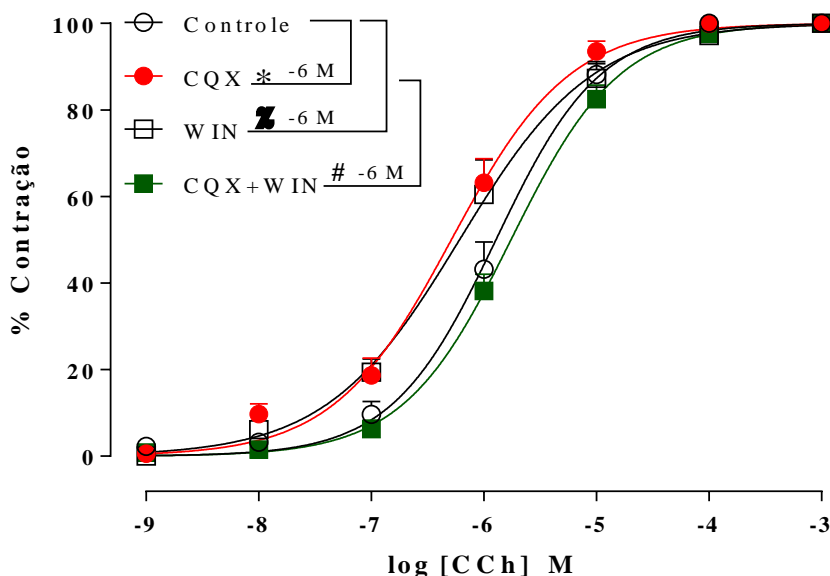
Observou-se também que, em comparação ao grupo “Controle”, o grupo “Win 55,212-2” (WIN) mostrou um aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) na porcentagem de contração referente à concentração de carbacol (em log) de -6 M ($43,2 \pm 6,2\%$ vs. $60,4 \pm 7,9\%$).

A **Figura 50-B** apresenta os valores (em log) das concentrações de carbacol que ocasionaram metade da resposta máxima (CE50), para os grupos experimentais. Foi possível observar que, em comparação ao grupo “Caquexia”, o grupo “Caquexia + Win 55,212-2” apresentou uma elevação estatisticamente significativa ($p < 0,05$) na CE50: -6,3 M [(-6,5 M) – (-6,1 M)] vs. -5,6 M [(-5,9 M) – (-5,5 M)].

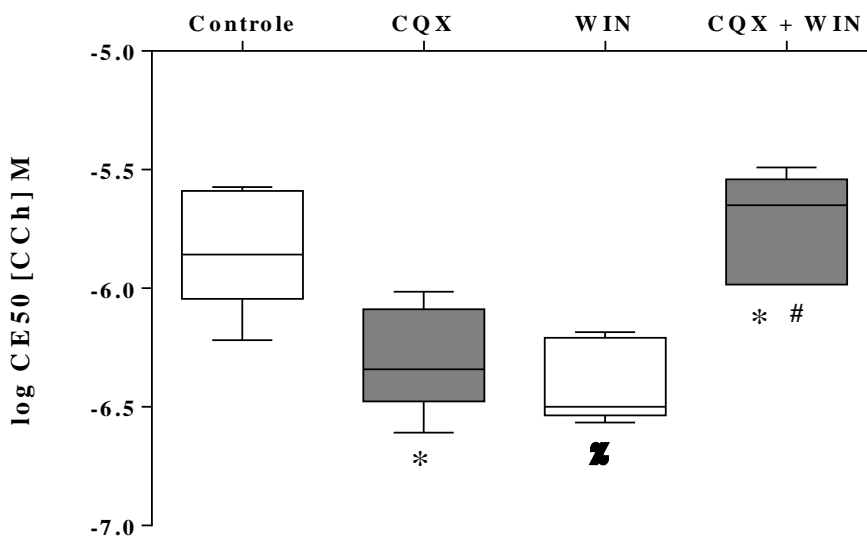
Observou-se que, comparado ao grupo “Controle”, o grupo “Win 55,212-2” mostrou uma redução ($p < 0,05$) na CE50: -5,8 M [(-6,0 M) – (-5,6 M)] vs. -6,5 M [(-6,5 M) – (-6,2 M)]. Comparado ao grupo “Win 55,212-2”, o grupo “Caquexia + Win” mostrou um aumento significativo ($p < 0,05$) na CE50: -6,5 M [(-6,5 M) – (-6,2 M)] vs. -5,6 M [(-5,9 M) – (-5,5 M)].

Figura 50 – Contratilidade de tiras isoladas de fundo gástrico de ratos com caquexia induzida, e previamente submetidos às administrações diárias com win 55,212-2.

A)



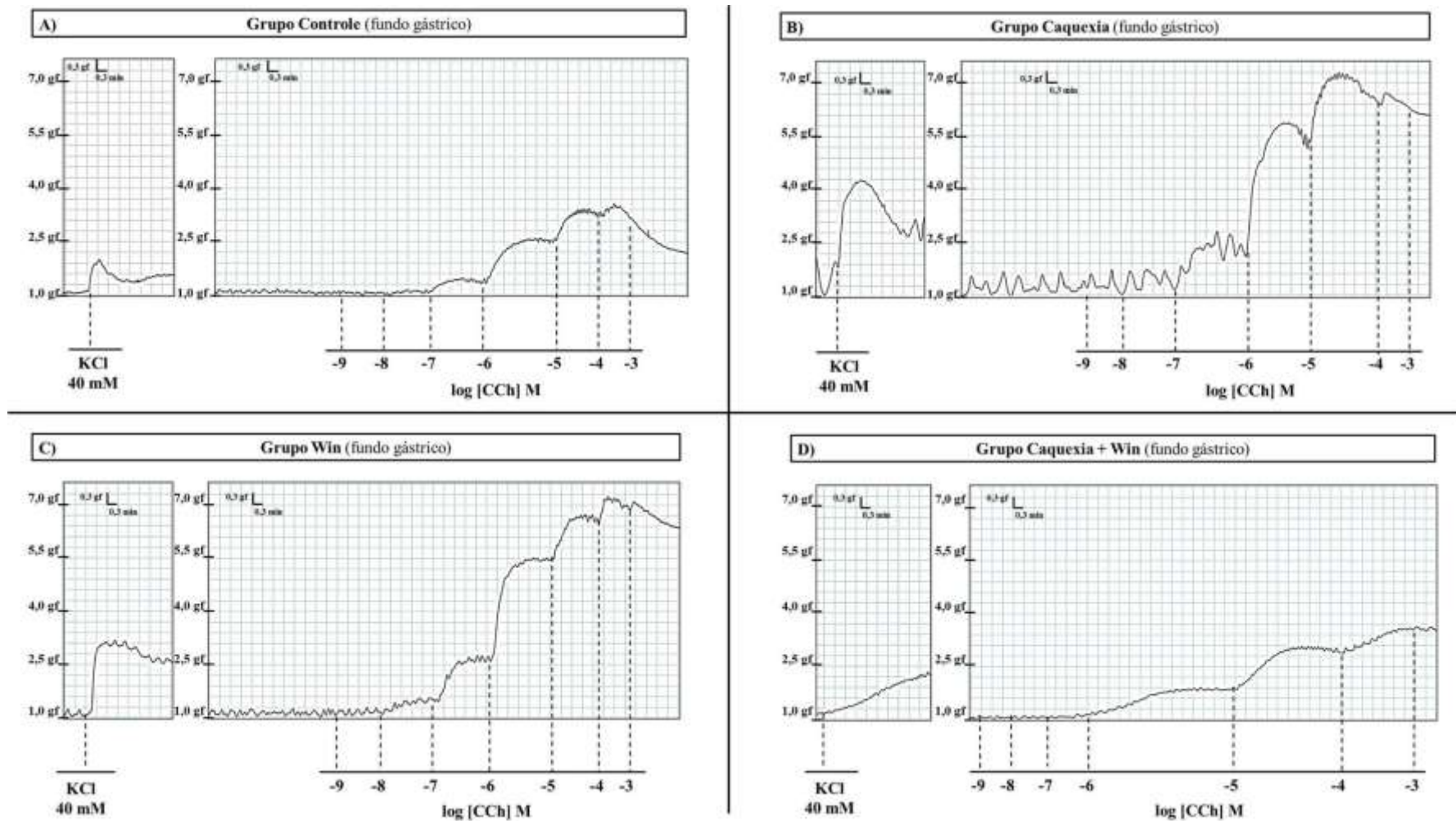
B)



Legenda: Curvas sigmóides de porcentagens de contração de tiras de fundo gástrico em função de concentrações cumulativas de carbacol (em log), de -9 M a -3 M (em A), e Valores da CE50 (em B), referentes aos grupos experimentais Controle (n=6), Caquexia (CQX, n=5), Win 55,212-2 (WIN, n=7), e Caquexia + Win 55,212-2 (CQX+WIN, n=7). Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m.) (em A) e mediana [(percentil 25%) – (percentil 75%)] (em B), e analisados estatisticamente por ANOVA two-way, seguido de teste de Tukey (em A), e ANOVA one-way, seguido de teste de Tukey (em B). M: molar. *: $p < 0,05$ (Em A: CQX vs. Controle. Em B: CQX vs. Controle / CQX+WIN vs. WIN). χ : $p < 0,05$ (Em A e B: WIN vs. Controle). #: $p < 0,05$ (Em A e B: CQX+WIN vs. CQX). **Fonte:** Própria.

A **Figura 51** apresenta os registros da resposta contrátil de tiras isoladas de fundo gástrico, que relacionam a tensão (em grama-força, gf) em função do estímulo colinérgico cumulativo (CCh -9M a -3M, em log), em sucessivos pontos de tempo, para os grupos: “Controle” (em A), “Caquexia” (em B), “Win” (em C) e “Caquexia + Win” (em D).

Figura 51 – Registros originais da contratilidade *in vitro* de tiras isoladas de fundo gástrico de ratos com caquexia induzida, e submetidos previamente às administrações diárias de win 55,212-2.



Legenda: Traçados, produzidos pela contratilidade de tiras isoladas de fundo gástrico frente ao estímulo colinérgico cumulativo, referentes aos grupos experimentais Controle (em A), Caquexia (em B), Win (em C) e Caquexia + Win (em D). *gf*: grama-força. *min*: minutos. *mM*: milimolar. *M*: molar. Escala: 0,3gf: 0,3min. **Fonte:** Própria.

Discussão

5 DISCUSSÃO

Pelos resultados obtidos, constatou-se que a sinalização simpática em receptores β_1 , avaliada através de administrações diárias de atenolol (20 mg/kg, v.o.), mostrou envolvimento na aceleração do esvaziamento gástrico *in vivo*, segundo as concentrações de acetaminofeno, e no aumento da responsividade de fundo gástrico *in vitro*, com a curva de concentração-resposta deslocada para a esquerda, nos ratos com caquexia induzida por células de Yoshida AH-130. Ademais, constatou-se a participação do nervo vago, analisada através da vagotomia subdiafragmática, e da via endocanabinoide, investigada por meio da administração diária de win 55,212-2 (2 mg/kg, s.c.), na regulação do índice de caquexia e da dismotilidade gástrica *in vivo* e *in vitro*, em ratos com caquexia induzida por células de Yoshida AH-130.

No presente trabalho, o estudo da motilidade gástrica, *in vivo*, foi realizado com o teste de absorção de acetaminofeno, o qual apresenta uma correlação adequada com outros métodos para avaliação do esvaziamento do estômago (NÄSLUND et al., 2000), pois pode ser igualmente determinado por fatores que afetam a taxa de esvaziamento, como a atividade autonômica e endócrina, variações no volume gástrico, temperatura e pH (HENS et al., 2017). Além disso, o acetaminofeno corresponde a uma ferramenta farmacológica útil, que não favorece resultados falso-positivos, pois, segundo Wang et al. (2019), não estimula a secreção de componentes que podem alterar a motilidade gástrica, como a grelina.

Os resultados iniciais mostraram que os animais experimentais com caquexia induzida por células tumorais de Yoshida AH-130, apresentaram uma redução significativa no consumo alimentar e na massa corporal, em associação com um elevado índice de caquexia.

Estes achados apresentaram concordância com aqueles obtidos no estudo de Ohbuchi et al. (2015), os quais mostraram diminuições significativas na ingestão alimentar e peso corporal, no sétimo dia após a indução de caquexia. Estudos mostraram que, na caquexia associada ao câncer, o estado catabólico relaciona-se diretamente com a ativação do sistema nervoso simpático (LACHOWSKA et al., 2016). Tem sido demonstrado também que a desnutrição e o catabolismo, na caquexia, são associados com uma resistência à grelina, uma vez que a ingestão alimentar reduzida é mantida (SOLOMOU; KORBONITS, 2014).

Após a observação das alterações o consumo alimentar, peso corporal e índice de caquexia, foram definidos delineamentos experimentais para a avaliação de possíveis alterações da motilidade gástrica, através do teste de absorção de acetaminofeno. Este foi previamente submetido a três etapas de validação.

Dessa forma, verificou-se inicialmente a sensibilidade do teste mediante alterações nos volumes de amostras de soro utilizadas. Os resultados mostraram que o uso de alíquotas inferiores ao valor padrão de 200 μ L, determinado nos protocolos presentes na literatura, não interferiu na determinação das concentrações de acetaminofeno ao final da análise, o que permitiu confirmar a sensibilidade do teste, quanto a este parâmetro.

Esta característica também tem sido observada pelo estudo metodológico de Afshari e Liu (1998) no qual foi destacado que a fácil reprodutibilidade, simplicidade e o emprego de um pequeno volume de amostras de soro, juntamente com uma especificidade e sensibilidade adequadas, torna o teste de absorção de acetaminofeno um método apropriado para a rotina de laboratórios, com um tempo de análise inferior a 30 minutos para amostra única.

Em seguida, foi investigado o efeito da dose utilizada (100 mg/kg) sobre a função hepática, avaliada por meio dos parâmetros bioquímicos: TGO/AST, TGP/ALT e albumina. Por meio dos resultados obtidos, demonstrou-se que a dose utilizada não ocasionou alterações nos marcadores bioquímicos citados. Em função deste resultado, e em comparação à dose empregada no estudo de Ahmed, Mohamad e Khaled (2014), de 3 g/kg ou 3000 mg/kg, por via oral, para indução de danos hepáticos em ratos, a dose usada no presente estudo não foi considerada hepatotóxica.

O teste de absorção de acetaminofeno foi executado no presente estudo através de coletas seriadas de amostras de 700 μ L de sangue, em seis pontos de tempo, o que totaliza um volume de 4,2 mL de sangue coletado ao final do método. Neste sentido, investigou-se se uma alteração da volemia, definida pela coleta de 4,0 mL (~ 4,2 mL), poderia ocasionar possíveis alterações do esvaziamento gástrico.

Os resultados mostraram que a coleta do volume de sangue total, citado anteriormente, não ocasionou alterações significativas do esvaziamento gástrico, analisado através das concentrações de acetaminofeno, o que viabiliza o emprego do volume coletado no presente estudo, ao longo dos seis pontos de tempo.

De acordo com Palheta Jr. et al. (2010), alterações severas da volemia podem ocasionar modificações no tônus gástrico. Estudos na literatura caracterizam, de forma diferencial, um estado de hipovolemia, seja através da retirada de 30% (FANG et al., 2006), 40% (HU et al., 2016), ou 50% de sangue dos animais experimentais (HU et al., 2014), cujo volume total de sangue foi calculado pela relação: 6,12 mL/100 g de peso corporal.

No presente estudo, foram utilizados animais com peso médio de 280 gramas, que, de acordo com a fórmula citada anteriormente, resulta em uma média de aproximadamente 17,136 mL de sangue total. Portanto, para os animais com este peso, a retirada de 4,2 mL de

sangue total, ao final do teste de absorção de acetaminofeno, não configura um estado de hipovolemia, uma vez que este valor é inferior à retirada de 30% (~5,1408 mL), 40% (~6,8544 mL) e 50% (~8,568 mL) do sangue total destes animais. É importante destacar também que, mesmo na possível ocorrência de uma variação no tônus gástrico, frente à retirada de 4,2 mL de sangue, os animais de todos os grupos experimentais foram submetidos às mesmas condições referentes ao procedimento de coleta.

Após a etapa de validação do teste de absorção de acetaminofeno, este foi empregado em ratos caquéticos. Os resultados mostraram alteração da motilidade gástrica, caracterizada pela aceleração do esvaziamento gástrico em ratos com caquexia induzida por células AH-130, em comparação aos ratos normais tratados com solução salina 0,9%.

Tem sido descrito na literatura que a ativação do sistema nervoso simpático está associada com o desenvolvimento de caquexia em pacientes com câncer (QUANJUN et al., 2013). Em adição, estudos com animais experimentais demonstraram que a adrenalina e noradrenalina causaram um aumento das concentrações circulantes de grelina (IWAKURA et al., 2011), e que essa elevação foi observada com a forskolina, um potente ativador da enzima adenilil ciclase, que mimetiza o efeito da noradrenalina (GAGNON; ANINI, 2012).

Tais achados permitiram estabelecer uma ligação entre o estímulo induzido pelo jejum ou estados severos de restrição alimentar, sobre o sistema nervoso simpático, e a consequente elevação de noradrenalina, a qual resulta na liberação de grelina do estômago (GOLDSTEIN et al., 2011). Esta desempenha um papel importante sobre as funções gástricas, tais como aumento da secreção e do esvaziamento gástrico (SANGER; FURNESS, 2016).

A realização dos protocolos *in vivo* foi complementada com a execução de métodos *in vitro*, através de estímulos colinérgicos cumulativos com carbacol, os quais mostraram que as tiras isoladas de fundo gástrico dos animais com caquexia induzida por células AH-130 apresentaram um aumento da resposta contrátil, em comparação àquelas provenientes dos animais pertinentes ao grupo controle, caracterizado por um deslocamento da curva concentração-resposta para a esquerda da curva do grupo controle não caquético.

Sugeriu-se que esta resposta pode ter ocorrido em razão da grelina liberada pelo estímulo colinérgico. Este achado é corroborado pelos resultados do estudo de Broglio et al. (2004), no qual demonstrou-se que as concentrações de grelina, em humanos, aumentaram após a administração de piridostigmina, um inibidor da enzima acetilcolinesterase, e diminuíram após a administração de pirenzepina, um antagonista muscarínico.

Estudos sugeriram que a grelina pode ser capaz de promover contrações gástricas de fase III, tanto centralmente quanto periféricamente, visto que seu receptor, assim como seu

mRNA, que são expressos no hipotálamo e em todo o trato gastrointestinal, tem sido relacionado ao processo de fosforilação da cadeia leve de miosina (MLC), no músculo liso (BAI et al., 2017).

De fato, estudos mostraram que sinalização promovida pela grelina causa a ativação da enzima fosfolipase C, e proteína quinase C, e um aumento na quantidade de diacilglicerol e cálcio intracelular (KOJIMA et al., 2001). O cálcio livre, juntamente com a calmodulina, por sua vez, pode ser capaz de ativar proteínas quinases que resultam na fosforilação da cadeia leve de miosina (KAMM; STULL, 1985).

Em oposição a estes achados, a realização dos protocolos *in vitro*, com segmentos de duodeno de ratos com caquexia induzida por células AH-130, mostrou que estes não apresentaram um aumento significativo da resposta contrátil, em comparação àqueles provenientes dos animais do grupo controle. De acordo com o estudo desenvolvido por Lee et al. (2002), regiões do trato gastrointestinal, como antro gástrico, duodeno, jejuno e cólon, apresentam baixa síntese de grelina, em comparação com o fundo gástrico, o qual é um dos principais produtores deste componente neuro-humoral.

Em adição, sugeriu-se que este achado pode ser justificado pela manutenção dos segmentos de duodeno, isolados em cubas, e privados do contato com a grelina sérica. Contudo, é importante ponderar que tal fato não inviabiliza um possível aumento da motilidade duodenal *in vivo*, uma vez que nestas condições, a porção proximal do intestino delgado encontra-se exposta às concentrações possivelmente elevadas de grelina na caquexia.

É importante destacar que, além de uma possível participação da grelina, outros componentes podem estar envolvidos. Estudos mostraram que, tanto no cérebro quando no plasma, têm sido observadas concentrações elevadas de triptofano, um componente precursor da serotonina (5-HT), o qual pode estar diretamente relacionado com o aumento da atividade serotoninérgica evidenciada no desenvolvimento da caquexia associada ao câncer (SUZUKI et al., 2013). A serotonina pode aumentar a contração do músculo liso por meio da ligação em receptores 5-HT₄ (CAMILLERI, 2014), ou diminuir a motilidade gástrica, através da ativação de receptores do tipo 5-HT₃ (BORNSTEIN, 2012; TOMINAGA et al., 2011).

Perturbações acentuadas na homeostase hormonal desenvolvem-se precocemente após o transplante do tumor, no modelo de caquexia induzida por células de Yoshida AH-130, o qual também está associado com a presença de concentrações elevadas de prostaglandina E₂ (PGE₂) no plasma sanguíneo (TESSITORE et al., 1993). No geral, as prostaglandinas possuem um efeito estimulatório no estômago proximal e um efeito inibitório no estômago distal (PENSTON; WORMSLEY, 1989).

Em um estudo desenvolvido com macacos Rhesus normais, tratados com metil-PGE₂, foi observado um aumento significativo no esvaziamento gástrico, em comparação com os controles (NOMPLEGGI et al., 1980). Em humanos, também foi demonstrado um aumento significativo na taxa de esvaziamento gástrico de líquidos, com o uso de 16,16-dimetil-PGE₂ (JOHANSSON; EKELUND, 1978; NYLANDER; MATTSSON, 1975).

Em prosseguimento, foram definidos delineamentos experimentais para a identificação das concentrações das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF- α em fundo gástrico de ratos com caquexia induzida por células de Yoshida AH-130.

Os resultados obtidos mostraram que no fundo gástrico dos animais experimentais com caquexia induzida por células AH-130, em comparação àqueles do grupo controle, não foram observadas elevações significativas nas concentrações de IL-1 β , IL-6 e TNF- α .

Estudos reportaram que, a grelina é capaz de suprimir a produção de citocinas, tanto *in vivo* quanto *in vitro* (DOS SANTOS et al., 2013), através da inibição do fator nuclear κ B (NF- κ B), o qual controla a produção de citocinas pró-inflamatórias, e que embora os mecanismos moleculares e alvos celulares que medeiam esta inibição ainda permaneçam indeterminados, sugere-se que o nervo vago desempenhe um papel importante na inibição, mediada pela grelina, da liberação de citocinas pró-inflamatórias (WU et al., 2007).

As citocinas podem ser secretadas ou apresentadas na forma de proteínas de membrana, que ligam-se em receptores específicos e desencadeiam sinais intracelulares nas células alvo (BOCKERSTETT; DIPAOLO, 2017), como as células do epitélio gastrintestinal (DIEGELMANN; OLSZAK; GOKE, 2012). Contudo, no presente estudo não foram estudadas as possíveis alterações nos receptores das citocinas avaliadas, o que impossibilita relacionar este aspecto ao resultado quantitativo obtido, para IL-1 β , IL-6 e TNF- α , no fundo gástrico de ratos com caquexia induzida por células AH-130.

É importante considerar também que, neste estudo, não foram avaliadas as concentrações de citocinas anti-inflamatórias, portanto, não é possível estabelecer uma eventual associação da dismotilidade gástrica observada com o *status* inflamatório geral no fundo gástrico. Contudo, pelos resultados encontrados, especula-se que não ocorra um balanço pró-inflamatório positivo, no fundo gástrico de ratos com caquexia, pois esta situação favoreceria uma diminuição da motilidade.

Segundo Lenk, Schuler e Adams (2010), as citocinas pró-inflamatórias TNF- α , INF- γ e IL-1 β são potentes ativadoras da expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), que produz altas concentrações de óxido nítrico. Este, por sua vez, exerce um efeito inibitório sobre a contração do músculo liso e diminui a motilidade (LI et al., 2015b).

É preciso destacar também que o resultado encontrado neste estudo não inviabiliza uma possível elevação de citocinas pró-inflamatórias, ao nível sistêmico, no modelo de caquexia induzida por células AH-130, pois estas proteínas são mediadoras importantes da caquexia, e podem ativar vias de degradação no músculo esquelético (BURCKART et al., 2010). Ainda assim, há exceções na literatura, tal como o estudo de Ruud e Blomqvist (2007), no qual não foram identificados aumentos nas concentrações plasmáticas de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IFN γ , no modelo de caquexia induzida por células de hepatoma de Morris-777.

Em continuidade, no que diz respeito aos resultados pertinentes à investigação da sinalização simpática em receptores β 1-adrenérgicos sobre as alterações fisiológicas e gástricas citadas anteriormente, observou-se que o atenolol, administrado diariamente, não atenuou a diminuição do consumo alimentar de ratos com caquexia induzida por células AH-130, em comparação com ratos caquéticos não tratados com atenolol.

Tal achado também permitiu sugerir que esta alteração também pode ser dependente de outros fatores ou vias, uma vez que, no estudo desenvolvido por Sze et al. (2018), destacou-se que o bloqueio, não seletivo, dos receptores β -adrenérgicos pode estar associado com uma melhora do apetite. De modo geral, tem sido descrito na literatura que o bloqueio dos receptores β 2 parece ter um efeito mais acentuado em comparação aos receptores β 1 (HYLTANDER et al., 2000; DEIBERT; DEFRONZO, 1980). Além disso, é preciso considerar que o antagonista, utilizado no estudo citado, foi empregado por um maior período de tempo (durante 1 ano), em comparação àquele usado na presente pesquisa.

Os resultados também mostraram que o atenolol, administrado diariamente, não atenuou a perda de peso corporal dos animais com caquexia induzida por células AH-130, em comparação aos animais caquéticos não administrados com atenolol. Sugeriu-se, neste caso, que esta alteração pode ser dependente de outros fatores ou vias, visto que no estudo de Clark et al. (2017) mostrou-se uma correlação positiva entre o tratamento com carvedilol, um antagonista adrenérgico não-seletivo, e o ganho de peso em pacientes caquéticos. Os ratos normais tratados com atenolol mostraram uma variação negativa significativa no peso corporal em comparação aos ratos normais não tratados com o atenolol. Segundo Mani et al. (2016), os β -bloqueadores podem reduzir a secreção de insulina e o ganho de peso corporal.

O bloqueio de receptores β 1 adrenérgicos também não foi capaz de atenuar o índice de caquexia em animais com caquexia induzida por células AH-130, em comparação com ratos caquéticos não tratados com atenolol. Este achado vai de encontro com os resultados obtidos no estudo de Horvathova et al. (2015), no qual observou-se que a simpatectomia farmacológica, com 6-hidroxiopamina hidrobromida (6-OHDA) não afetou a incidência do

tumor ascítico nos animais caquéticos com bloqueio simpático (80%) em comparação àqueles não tratados com 6-OHDA (80,9%).

Em prosseguimento, observou-se que a administração de atenolol resultou em uma atenuação do aumento do esvaziamento gástrico dos ratos com caquexia induzida por células de Yoshida AH-130, em comparação com ratos caquéticos não tratados com atenolol, o que permitiu sugerir que a liberação de componentes humorais, mediados por receptores β_1 , como grelina, pode ser um dos fatores envolvidos na dismotilidade gástrica observada.

Estes achados são corroborados por resultados de pesquisas, os quais apontaram que as concentrações de grelina, aumentadas no estado de jejum, foram inibidas pela administração de atenolol (YAKABI et al., 2014) e reserpina, um alcaloide que causa depleção de catecolaminas dos terminais nervosos simpáticos (ZHAO et al., 2010). Nesse contexto, uma diminuição nas concentrações de grelina pode levar a uma redução no esvaziamento gástrico (KALKAN; SOYKAN, 2018).

De forma corroborativa aos protocolos realizados *in vivo*, os protocolos *in vitro* apontaram uma atenuação da resposta contrátil, frente ao estímulo cumulativo com carbacol, de tiras de fundo gástrico de ratos com caquexia induzida por células AH-130, tratados com atenolol, caracterizada por um deslocamento da curva de concentração-resposta para a direita, em comparação àquela de ratos com caquexia não tratados com atenolol.

Este achado pode ser justificado por uma inibição da liberação de grelina, pelas administrações diárias de atenolol, pois a secreção deste peptídeo, pelas células oxínticas X/A do fundo gástrico (VELDHUIS; BOWERS, 2010) é regulada positivamente por estímulos adrenérgicos (SANGER et al., 2017).

A inervação adrenérgica no trato gastrointestinal tem sido investigada em pesquisas, tais como os estudos pioneiros de Norberg e Sjoqvist (1966). Posteriormente estudos mais acurados, como de Walter et al. (2016), apontaram a presença de uma co-inervação simpática substancial tanto em neurônios ganglionares no plexo mioentérico, quanto no músculo liso.

Em continuação, no que diz respeito aos resultados relacionados à investigação da sinalização parassimpática, via nervo vago, sobre as alterações fisiológicas e gástricas descritas inicialmente, observou-se que a secção das vias vagais, de ratos com caquexia induzida por células AH-130, não atenuou a diminuição do consumo alimentar, em comparação com ratos caquéticos não vagotomizados.

Em um estudo desenvolvido por Arnold et al. (2006), foi reportado um aumento na ingestão alimentar de ratos, submetidos à secção das vias vagais aferentes, e tratados com grelina exógena. Este fato permitiu especular que, no presente estudo, a diminuição do

consumo alimentar pode apresentar relação com a sinalização vagal aferente, porém, não foram obtidos resultados positivos, pois realizou-se uma desnervação vagal total.

Os resultados obtidos também mostraram que a vagotomia subdiafragmática em ratos com caquexia induzida por células AH-130 não atenuou a perda de peso, em comparação aos animais caquéticos não submetidos à vagotomia. De maneira semelhante, no estudo de Borner et al. (2017), observou-se que a perda de peso corporal associada ao câncer não foi atenuada pela desnervação de vias aferentes. Neste caso, é possível especular que a perda de peso pode ser um fator dependente de outros componentes neurais ou humorais.

Interessantemente, observou-se uma atenuação no índice de caquexia, dos animais com caquexia induzida por células AH-130, submetidos previamente à vagotomia, em comparação aos animais caquéticos não submetidos à secção do nervo vago. Sugeriu-se, neste caso, que houve uma possível inibição na proliferação tumoral, e conseqüentemente no peso do líquido tumoral, que é um dos parâmetros utilizados para o cálculo do índice de caquexia.

De forma oposta, resultados obtidos no estudo de Horvathova e Mravec (2016), não apontaram diferenças na incidência de tumor ascítico em animais caquéticos previamente vagotomizados (58,3%), e animais caquéticos falso-operados (83,3%). Contudo, é preciso considerar que no estudo citado não foi avaliado o peso do líquido tumoral, o qual é uma das variáveis utilizadas para a determinação do índice de caquexia.

Em continuação, por meio dos resultados obtidos nos protocolos *in vivo*, observou-se uma atenuação da motilidade gástrica aumentada nos animais com caquexia induzida por células AH-130, previamente submetidos à vagotomia troncular subdiafragmática, em comparação aos animais caquéticos não submetidos à secção do nervo vago. Este achado permitiu pressupor a importância da integridade das vias vagais para a ocorrência de dismotilidade gástrica em ratos com caquexia.

Estudos demonstraram que tanto a vagotomia truncal, quanto a ablação vagal aferente, foram capazes de prevenir as ações da grelina, no sistema nervoso central, após sua administração periférica (DATE et al., 2002), o que permitiu sugerir que a grelina transmite sinais ao SNC e aumenta a função gástrica, através de estímulos sobre vias vagais aferentes (WU; KRAL, 2004), que se projetam ao hipotálamo (FOX; BIDDINGER, 2012).

Estudos na literatura, como o desenvolvido por Yakabi et al., 2010, mostraram que a vagotomia não reduziu as concentrações de grelina hipotalâmica em ratos normais, em comparação àqueles observados em ratos não vagotomizados, tratados com solução salina. Dessa forma, é importante pontuar que mesmo, na possibilidade da manutenção de concentrações elevadas de grelina, nos animais caquéticos vagotomizados, os seus efeitos *in*

vivo sobre a motilidade gástrica continuarão atenuados, face à dependência majoritária das vias vagais.

Interessantemente, não observou-se diferença estatística no esvaziamento gástrico de animais vagotomizados administrados com solução salina 0,9%, em comparação com animais normais com inervação vagal intacta. Este mesmo fenômeno também foi observado nos resultados obtidos por Silva et al. (2016).

Os achados alcançados por meio dos protocolos *in vivo* foram apoiados pelos resultados obtidos por meio da realização de protocolos *in vitro*, os quais apontaram uma atenuação da resposta contrátil de tiras isoladas de fundo gástrico de ratos com caquexia induzida por células AH-130, previamente submetidos à vagotomia, caracterizada por um deslocamento da curva de concentração-resposta para a direita, em comparação àquela proveniente de animais caquéticos não submetidos à secção do nervo vago.

Sugeriu-se, neste caso, que a atenuação da resposta contrátil em tiras isoladas de fundo gástrico de animais caquéticos vagotomizados, pode ser justificada pelos resultados obtidos por um estudo desenvolvido por Lee et al. (2002), no qual foi identificada, em animais vagotomizados, uma redução quantitativa no mRNA de grelina no estômago, porém um aumento nas concentrações plasmáticas de grelina, em comparação ao grupo controle.

Curiosamente nas tiras isoladas de fundo de estômago, de animais normais vagotomizados, foi identificada uma resposta contrátil significativamente elevada, caracterizada por um deslocamento da curva de concentração-resposta para a esquerda, em comparação àquela proveniente de animais normais não vagotomizados. Tal fenômeno também foi observado durante pesquisa desenvolvida por Silva et al. (2016), na qual foi especulada uma possível ocorrência de suprarregulação de receptores colinérgicos muscarínicos.

Ademais, hipotetizou-se que o referido fenômeno de suprarregulação de receptores não tenha ocorrido em tiras de fundo gástrico de animais vagotomizados com caquexia induzida por células AH-130, devido possivelmente ao estresse oxidativo, o qual é um dos fenótipos metabólicos bem estabelecidos nos casos de neoplasias (NAKAMURA et al., 2018).

O estresse oxidativo pode afetar negativamente os processos de transcrição e tradução de receptores de membrana, através de alterações oxidativas no DNA que resultam em perturbação da expressão de genes e proteínas ou do mRNA (GUAN, 2008). No estudo de Guan et al. (2001), foi identificada uma redução quantitativa no mRNA da subunidade $\alpha 7$ de receptores nicotínicos, em cultura de células de feocromocitoma, que foram causados pelo efeito do estresse oxidativo no nível transcricional, traducional e pós-traducional.

Em prosseguimento, com relação aos resultados referentes à investigação da via endocanabinoide sobre as alterações fisiológicas e gástricas citadas anteriormente, constatou-se, pelos resultados obtidos, que as administrações diárias de win 55,212-2, aos animais com caquexia induzida por células AH-130, não ocasionaram uma atenuação da redução do consumo alimentar, em comparação aos ratos caquéticos não administrados com a substância.

Estudos mostraram que a ativação farmacológica aguda de receptores endocanabinoides tipo 1 (CB1), no sistema nervoso central, é capaz de aumentar a ingestão alimentar (REUTER; MARTIN, 2016), uma vez que, conforme reportado no trabalho de Senin et al. (2013), o agonismo em receptores CB1 pode causar a secreção de grelina através da via relacionada a receptores do alvo mecanístico da rifampicina (mTOR).

Entretanto, estudos têm destacado que uma resistência à grelina pode estar envolvida no desenvolvimento de caquexia, tal como observado no trabalho de Terawaki et al. (2017), no qual a caquexia em ratos foi induzida por células 85As2 de câncer gástrico. Sugeriu-se, portanto, que tal fato, pode justificar este resultado encontrado no presente estudo.

Concernente à variação de peso corporal, observou-se que os animais com caquexia induzida por células AH-130, previamente submetidos às administrações diárias de win 55,212-2, não apresentaram uma atenuação da perda de peso, em comparação aos animais caquéticos não administrados com o agonista canabinoide. Sugeriu-se neste caso, que esta alteração pode ser dependente de outros componentes ou vias de sinalização.

Achados semelhantes tem sido reportados em estudos, nos quais a administração de win 55,212-2 não ocasionou ganho de peso em animais experimentais com câncer de próstata induzido por células PC3 (ROBERTO; KLOTZ; VENKATESWARAN, 2018), câncer ósseo induzido por células NCTC-2472 (HALD et al. 2008), e tumor epidérmico induzido por células PDV.C57 (CASANOVA et al., 2003).

De acordo com a literatura, ainda não há uma abordagem farmacológica definida que cause aumento no peso corporal mediante a ativação de receptores CB1, nos casos de caquexia ou anorexia (HORN et al., 2018), uma vez que nestas situações os subprodutos biológicos liberados pelo tumor, juntamente com as anormalidades metabólicas podem levar a uma desregulação no sistema endocanabinoide, tanto em vias centrais quanto periféricas (OSEI-HYIAMAN, 2007).

Curiosamente, observou-se que os animais não caquéticos, submetidos às administrações diárias de win 55,212-2, apresentaram uma variação negativa do peso corporal, em comparação aos animais normais administrados com solução salina 0,9%. De forma oposta, no estudo de Radziszewska e Bojanowska (2013), o emprego do agonista

canabinoide na dose de 2mg/kg não diminuiu o peso corporal, porém tal alteração foi observada com a dose de 4 mg/kg.

Entretanto, é preciso considerar que no estudo citado, foi realizada a administração do win 55,212-2 em um único dia, enquanto que no presente estudo foram realizadas administrações diárias. Sugeriu-se, portanto que a perda de peso pode ser resultado de um possível efeito cumulativo das doses ao longo dos dias. Este fenômeno tem sido reportado em estudos, tal como o de Costa et al. (2004), no qual observou-se um efeito cumulativo com a administração diária de 0,5mg/kg do agonista canabinoide, sobre a analgesia em ratos.

De forma semelhante aos resultados obtidos com a vagotomia subdiafragmática, constatou-se que as administrações diárias de win 55,212-2, aos animais com caquexia induzida por células AH-130, ocasionaram uma redução do índice de caquexia, em comparação aos ratos caquéticos não administrados com o agonista canabinoide. Tendo em vista que este parâmetro é dependente do peso do líquido tumoral, especulou-se que o referido agonista pode ter ocasionado uma modulação negativa do desenvolvimento do tumor ascítico.

Estudos têm sugerido que os agonistas canabinoides possuem atividade antitumoral, evidenciada tanto em métodos *in vitro* quanto em modelos animais, o que permitiu pressupor que os canabinoides podem ser utilizados como inibidores da proliferação tumoral (MARTÍNEZ-MARTÍNEZ et al., 2015).

De fato, tem sido descrito, na literatura, os efeitos antitumorais do win 55,212-2 sobre células de carcinoma renal (KHAN et al., 2018), células de osteossarcoma M6-63 (NIU et al., 2015), modelo murino de câncer gástrico (OH et al., 2013), e câncer de mama (QAMRI et al., 2009). Estes efeitos decorrem da indução de apoptose e inibição da proliferação celular, modulação da resposta imune, através da regulação da sinalização envolvida em processos tumorais, como aquelas relacionadas com as enzimas PI3K/Akt, adenilil-ciclase, PKA, ERK e MAPK (KHAN et al., 2016).

Além disso, segundo estudo desenvolvido por Suk et al. (2016), os efeitos antitumorais dos agonistas canabinoides também podem decorrer da ativação de receptores CB2, uma vez que em camundongos CB2-*knockout* observou-se um aumento da carcinogênese hepática. No estudo de Mukhopadhyay et al. (2015), também propôs-se que o bloqueio de receptores CB2 não atenuou a proliferação de células de hepatocarcinoma.

Com relação aos resultados obtidos sobre a função gástrica, observou-se que as administrações diárias de win 55,212-2 resultaram em uma atenuação do esvaziamento gástrico de ratos com caquexia induzida por células AH-130, em comparação aos animais caquéticos não administrados com o agonista canabinoide.

Estudos mostraram que o win 55,212-2 ocasiona uma redução pré-sináptica da liberação de neurotransmissores excitatórios, principalmente a acetilcolina (VERA; FICHNA; ABALO, 2017). Sugeriu-se, assim a importância da transmissão colinérgica, representada pela liberação de acetilcolina, para a manutenção da dismotilidade gástrica *in vivo* de ratos com caquexia induzida por células de Yoshida AH-130.

As vias colinérgicas e adrenérgicas podem estar envolvidas no efeito excitatório da grelina, sobre a motilidade gástrica, através de fibras vagais que se projetam para o sistema nervoso entérico, no entanto inúmeros trabalhos de pesquisa apontaram um maior envolvimento dos receptores colinérgicos periféricos tipo-M (WANG et al., 2015).

Tem sido reportado na literatura que a administração de win 55,212-2, por sete dias, ocasionou uma dessensibilização de receptores CB1 no SNC (LLORENTE-OVEJERO et al., 2018), contudo, o desenvolvimento de tolerância, em função de uma possível dessensibilização de CB1, ao nível gástrico, não tem sido relatado (ABALO et al., 2009). O resultado encontrado neste estudo corrobora, portanto, com tal fato.

Curiosamente, a curva de concentração de acetaminofeno *versus* tempo, para o grupo de ratos normais, e animais com caquexia induzida por células AH-130, ambos administrados com win 55,212-2, apresentou dois picos máximos. O aparecimento de picos duplos após a administração oral de acetaminofeno não é um fenômeno incomum e tem sido descrito na literatura, tal como visto no estudo de Henze et al. (2018) realizado com mini cobaias. O motivo exato para o aparecimento de picos duplos não está totalmente elucidado, contudo estudos tem sugerido que variações no processo de esvaziamento gástrico podem ser uma das causas envolvidas (METSUGI et al., 2008).

Os resultados obtidos por meio da realização dos protocolos *in vivo* encontraram concordância com aqueles provenientes dos protocolos *in vitro*, por meio dos quais foi possível constatar uma atenuação da resposta contrátil de tiras isoladas de fundo gástrico de ratos com caquexia induzida por células AH-130, submetidos às administrações diárias de win 55,212-2, caracterizada por um deslocamento da curva de concentração-resposta para a direita, em comparação àquela proveniente de animais caquéticos não administrados com o agonista canabinoide. Sugeriu-se que este efeito ocorreu devido à ação do win 55,212-2 nos receptores CB1 em neurônios nas tiras de fundo gástrico.

Os agonistas canabinoides possuem a capacidade de ativar receptores CB1 presentes em neurônios motores do plexo mioentérico, que resulta em uma redução na liberação de neurotransmissores excitatórios e, conseqüente, atenuação do tônus do músculo liso (ABALO et al., 2012). Como exemplo, tem-se o estudo *in vitro*, realizado por Abalo et al. (2015), no

qual foi reportada uma redução no tônus basal de tecidos gastrintestinais por meio da adição de win 55-212,2 em concentrações cumulativas.

Semelhantemente ao perfil de resposta contrátil apresentado pelas tiras de fundo gástrico de ratos normais vagotomizados, também foi identificado um aumento da responsividade, ao estímulo com carbacol, de tiras de fundo gástrico de ratos normais submetidos às administrações diárias de win 55-212,2, caracterizada por um deslocamento da curva de concentração-resposta para a esquerda, em comparação àquela proveniente de animais normais não tratados com win-55,212-2. Como a administração do agonista canabinoide ocorreu diariamente, sugeriu-se uma possível ocorrência de suprarregulação de receptores colinérgicos no fundo gástrico de ratos não-caquéticos.

Similarmente às tiras de fundo gástrico dos animais vagotomizados com caquexia, sugeriu-se que o fenômeno da suprarregulação de receptores colinérgicos também não tenha ocorrido com as tiras de fundo de estômago de animais caquéticos submetidos às administrações diárias de win 55,212-2, por conta possivelmente do estresse oxidativo.

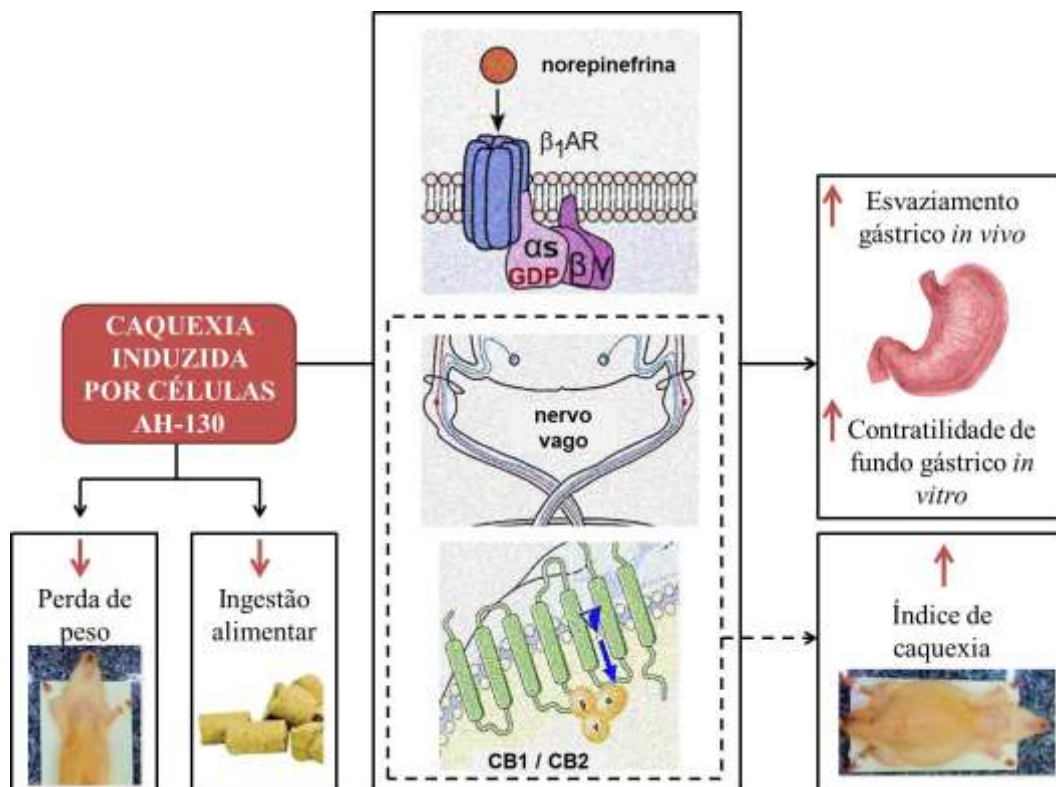
Os resultados de todos os parâmetros avaliados neste estudo, para os grupos experimentais, encontram-se sintetizados no **Quadro 12**.

Quadro 12 – Síntese dos principais resultados obtidos.					
Variáveis Grupos	Δ Consumo alimentar	Δ Peso Corporal	Índice de caquexia	Esvaziamento gástrico	Contratibilidade fundo gástrico
Controle	►	►	►	►	►
CQX	▼ <i>vs. Controle</i>	▼ <i>vs. Controle</i>	▲ <i>vs. Controle</i>	▲ <i>vs. Controle</i>	▲ <i>vs. Controle</i>
ATN	— <i>vs. Controle</i>	▼ <i>vs. Controle</i>	— <i>vs. Controle</i>	— <i>vs. Controle</i>	— <i>vs. Controle</i>
CQX + ATN	— <i>vs. CQX</i>	▼ <i>vs. CQX</i>	— <i>vs. CQX</i>	▼ <i>vs. CQX</i>	▼ <i>vs. CQX</i>
VGX	— <i>vs. Controle</i>	— <i>vs. Controle</i>	— <i>vs. Controle</i>	— <i>vs. Controle</i>	▲ <i>vs. Controle</i>
VGX + CQX	— <i>vs. CQX</i>	— <i>vs. CQX</i>	▼ <i>vs. CQX</i>	▼ <i>vs. CQX</i>	▼ <i>vs. CQX</i>
WIN	— <i>vs. Controle</i>	▼ <i>vs. Controle</i>	— <i>vs. Controle</i>	— <i>vs. Controle</i>	▲ <i>vs. Controle</i>
CQX + WIN	— <i>vs. CQX</i>	— <i>vs. CQX</i>	▼ <i>vs. CQX</i>	▼ <i>vs. CQX</i>	▼ <i>vs. CQX</i>

Legenda: Quadro esquemático com as variações dos parâmetros avaliados neste estudo, para os grupos experimentais: Controle, Caquexia (CQX), Caquexia + Atenolol (CQX+ATN), Vagotomia + Caquexia (VGX+CQX) e Caquexia + Win 55,212-2 (CQX+WIN). ►: grupo Controle. —: não significativo. ▼ / ▲: elevação / diminuição significativa. **Fonte:** Própria.

A seguir, na **Figura 52**, é mostrado um esquema integrado dos principais resultados encontrados no presente estudo.

Figura 52 – Esquema dos possíveis mecanismos envolvidos nas alterações fisiológicas e gástricas em ratos com caquexia induzida por células de Yoshida AH-130.



Legenda: β 1AR: Receptor beta-1 adrenérgico. $\alpha\beta\gamma$: subunidades alfa, beta e gama da proteína G. GDP: Difosfato de guanosina. CB1/CB2: Receptor endocanabinoide tipo 1 e tipo 2. O traçado pontilhado delimita os dois possíveis mecanismos envolvidos na alteração apontada. **Fonte:** Própria.

De forma geral, frente aos resultados obtidos, elencados e discutidos anteriormente, espera-se contribuir para uma ampliação do conhecimento teórico acerca das repercussões da caquexia sobre a função gástrica, e fornecer subsídios científicos para o desenvolvimento de estudos posteriores com fins investigativos e terapêuticos sobre o tema tratado.

É imperioso destacar, também, que o estudo da caquexia, induzida por células de Yoshida AH-130, em ratos *Wistar*, não inviabiliza a aplicabilidade dos resultados para os casos de pacientes com caquexia. Apesar da presença de variações anatômicas evidentes entre o estômago de roedores e humanos, estudos apontam uma analogia na inervação e na estrutura histológica, relativas à região glandular, o que tornam os modelos experimentais murinos bastante úteis em pesquisas sobre patologias com alterações gástricas (KAMPE et al., 2009).

Conclusões

6 CONCLUSÕES

Em vista dos resultados obtidos no presente estudo, foi possível concluir que:

- A diminuição no consumo alimentar, a redução no peso corporal e o elevado índice de caquexia, em ratos com caquexia induzida por células AH-130, estão relacionados com uma dismotilidade gástrica caracterizada por uma aceleração no esvaziamento do estômago, bem como por um aumento da atividade contrátil *in vitro* de tiras isoladas de fundo gástrico, e concentrações não aumentadas de IL-1 β , IL-6 e TNF- α em fundo gástrico de ratos com caquexia induzida;
- Em condições patológicas e fisiológicas, o esvaziamento gástrico pode ser avaliado por meio de ferramentas farmacológicas, como o teste de absorção de acetaminofeno, o qual apresentou sensibilidade frente às variações volumétricas nas amostras de soro, ausência de hepatotoxicidade com a dose empregada, e a viabilidade de coletas seriadas de sangue;
- A ativação simpática de receptores β 1 adrenérgicos não mostrou relação com a redução do consumo alimentar, peso corporal e índice de caquexia, mas um envolvimento direto com a dismotilidade gástrica de ratos com caquexia induzida por células AH-130;
- As vias vagais aferentes e eferentes não apresentaram relação com a redução do consumo alimentar e peso corporal, no entanto, parecem estar diretamente envolvidas na modulação do índice de caquexia e da dismotilidade gástrica de ratos com caquexia induzida por células AH-130;
- A ativação de vias endocanabinoides não demonstrou relação com a redução do consumo alimentar e peso corporal, entretanto, parece exercer participação na modulação do índice de caquexia e da dismotilidade gástrica de ratos com caquexia induzida por células AH-130.

7 PERSPECTIVAS DE NOVOS ESTUDOS

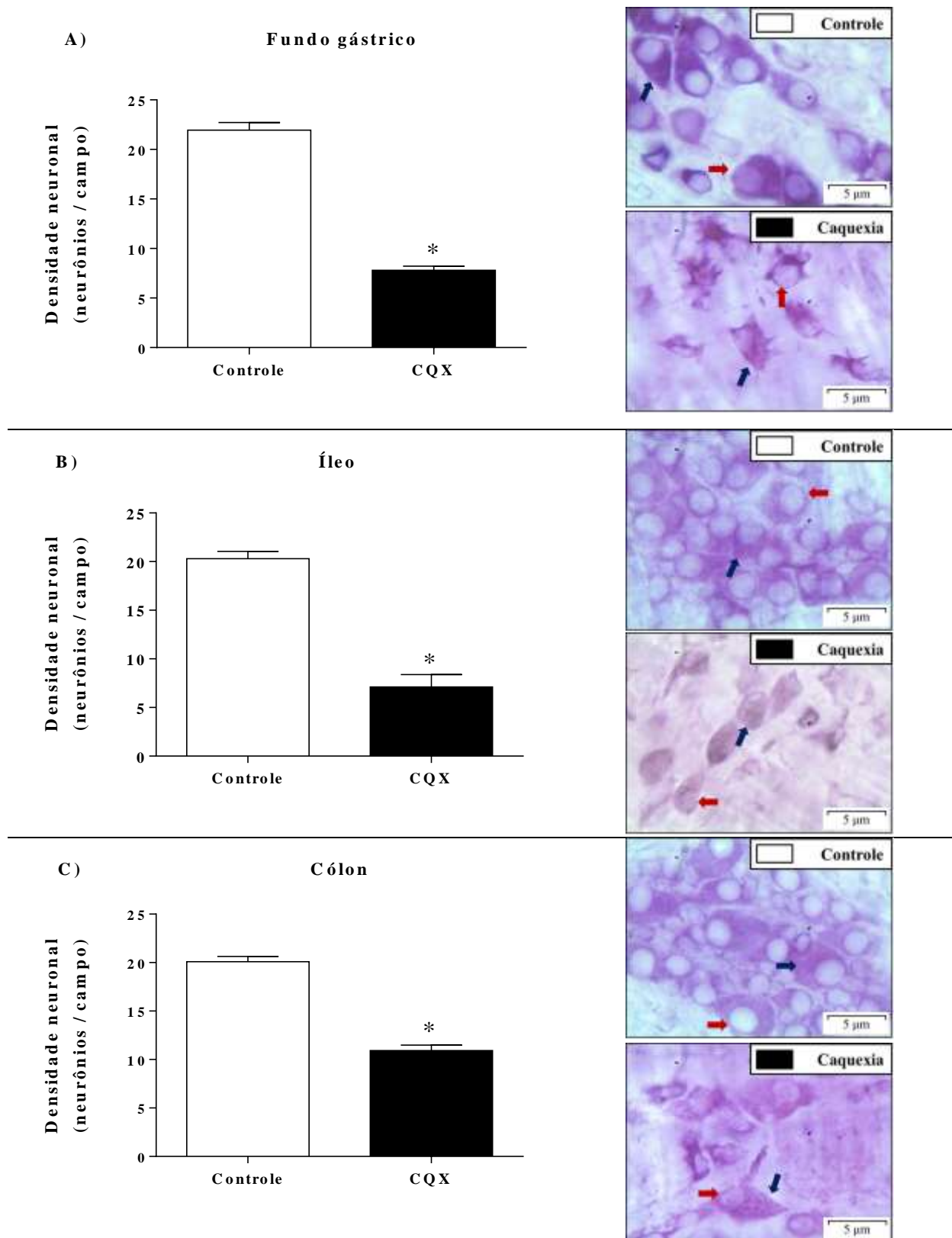
Mediante os resultados obtidos, deseja-se realizar estudos mais acurados para a determinação da participação da grelina sobre a dismotilidade gástrica de ratos com caquexia, bem como do envolvimento de outros componentes neurais, endócrinos e humorais sobre as alterações fisiológicas e gástricas observadas nesta síndrome, em associação com a análise da taxa de sobrevivência dos animais com caquexia.

No contexto das alterações gástricas, o grupo de pesquisa deste referido trabalho iniciou um estudo piloto concernente ao impacto da caquexia sobre a densidade neuronal global em amostras de fundo gástrico, íleo e cólon de ratos com caquexia induzida por células tumorais de Yoshida AH-130, cujos resultados encontram-se mostrados na **Figura 53**.

A **Figura 53-A, B e C** apresenta, respectivamente a densidade neuronal em fundo gástrico, íleo e cólon, para os grupos experimentais “Controle” e “Caquexia”. Observou-se que, em comparação ao grupo “Controle”, o grupo “Caquexia” apresentou uma redução estatisticamente significativa ($p < 0,05$) na densidade de neurônios mioentéricos, em fundo gástrico ($21,9 \pm 0,8$ neurônios/campo vs. $7,8 \pm 0,4$ neurônios/campo), íleo ($20,3 \pm 0,8$ neurônios/campo vs. $7,1 \pm 1,3$ neurônios/campo) e cólon ($20,1 \pm 0,6$ neurônios/campo vs. $10,9 \pm 0,6$ neurônios/campo).

Em vista dos resultados concernentes às alterações em neurônios mioentéricos decorrentes da caquexia, almeja-se, também, que maiores estudos acerca de tais alterações sejam continuados, no sentido de elucidar, de forma minuciosa, os possíveis mecanismos subjacentes ao impacto da caquexia em componentes do sistema nervoso entérico.

Figura 53 – Densidade global de neurônios mioentéricos de ratos com caquexia induzida.



Legenda: Valores médios da densidade neuronal em fundo gástrico (em **A**), íleo (em **B**), e cólon (em **C**), referentes aos grupos experimentais Controle (n=6) e Caquexia (n=6), juntamente com as respectivas fotomicrografias de neurônios marcados por técnica de histoquímica, observados em microscopia de luz, sob aumento de 1000x (as setas vermelhas e as setas azuis apontam respectivamente o núcleo e o citoplasma dos neurônios). Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m.), e analisados estatisticamente por Teste t-Student não pareado. *: $p < 0,05$ (Em **A**, **B** e **C**: CQX vs. Controle). Escala: 5 μ m. **Fonte:** Própria.

REFERÊNCIAS

- ABALO, R.; CABEZOS, P. A.; LÓPEZ-MIRANDA, V.; VERA, G.; GONZÁLEZ, C.; CASTILLO, M.; FERNÁNDEZ-PUJOL, R.; MARTÍN, M. I. Selective lack of tolerance to delayed gastric emptying after daily administration of WIN 55,212-2 in the rat. **Neurogastroenterology & Motility**, v.21, n.9, p.1002-e80, 2009.
- ABALO, R.; CABEZOS, P. A.; VERA, G.; FERNÁNDEZ-PUJOL, R.; MARTÍN, M. I. The cannabinoid antagonist SR144528 enhances the acute effect of WIN 55,212-2 on gastrointestinal motility in the rat. **Neurogastroenterology & Motility**, v.22, n.6, p.694–e206, 2010.
- ABALO, R.; CABEZOS, P. A.; VERA, G.; LÓPEZ-MIRANDA, V.; HERRADÓN, E.; MARTÍN-FONTELLES, M. I. Cannabinoid-induced delayed gastric emptying is selectively increased upon intermittent administration in the rat: role of CB1 receptors. **Neurogastroenterology & Motility**, v.23, n.5, p.457–e177, 2011.
- ABALO, R.; CHEN, C.; VERA, G.; FICHNA, J.; THAKUR, G. A.; LÓPEZ-PÉREZ, A. E.; STORR, M. In vitro and non-invasive in vivo effects of the cannabinoid-1 receptor agonist AM841 on gastrointestinal motor function in the rat. **Neurogastroenterology & Motility**, v.27, n.12, p.1721–1735, 2015.
- ABALO, R.; VERA, G.; LÓPEZ-PÉREZ, A.E.; MARTÍNEZ-VILLALUENGA, M. MARTIN-FONTELLES, M.I. The gastrointestinal pharmacology of cannabinoids: focus on motility. **Pharmacology**, v.90, p.1–10, 2012.
- AFSHARI, T.; LIU, T. Development of a rapid spectrophotometer screening method for quantification of Acetaminophen in human serum. **Medical Journal of the Islamic Republic of Iran**, v.2, n.3, p.243-47, 1988.
- AHMED, K. A.; MOHAMAD, Y. R.; KHALED, E. A. S. Protective effect of ghrelin on paracetamol induced acute hepatotoxicity in rats. **Journal of Physiology and Pathophysiology**, v.5, n.2, p.7–14, 2014.
- ALABRESI, M. F. F.; QUINI, C. C.; MATOS, J. F.; MORETTO, G. M.; AMERICO, M. F.; GRAÇA, J. R. V.; SANTOS, A. A.; OLIVEIRA, R. B.; PINA, D. R.; MIRANDA, J. R. A. Alternate current biosusceptometry for the assessment of gastric motility after proximal gastrectomy in rats: a feasibility study. **Neurogastroenterology and Motility**, v.27, n.11, p. 1613-1620, 2015.
- ALI, S.; CHEN, J.; GARCIA, J. M. Clinical development of ghrelin axis-derived molecules for cancer cachexia treatment. **Current Opinion in Supportive and Palliative Care**, v.7, p.368-375, 2013.
- AMEKYEYEH, H.; BILLA, N.; YUEN, K. H.; CHIN, S. L. A gastrointestinal transit study on amphotericin B-loaded solid lipid nanoparticles in rats. **American Association of Pharmaceutical Scientists PharmSciTech**, v.16, p. 871-7, 2015.

ANANDAVADIVELAN, P.; LAGERGREN, P. Cachexia in patients with oesophageal cancer. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v.13, n.3, p.185-198, 2016.

ANDREWS, Z. B. Central mechanisms involved in the orexigenic actions of ghrelin. **Peptides**, v.32, p.2248-2255, 2011.

ANGELI, T. R.; CHENG, L. K.; DU, P.; WANG, T. H.; BERNARD, C. E.; VANNUCCHI, M. G.; FAUSSONE-PELLEGRINI, M. S.; LAHR, C.; VATHER, R.; WINDSOR, J. A.; FARRUGIA, G.; ABELL, T. L.; O'GRADY, G. Loss of interstitial cells of Cajal and patterns of gastric dysrhythmia in patients with chronic unexplained nausea and vomiting. **Gastroenterology**, v.149, n.1, p.56-66, 2015.

AOYAGI, T.; TERRACINA, K. P.; RAZA, A.; MATSUBARA, H.; TAKABE, K. Cancer cachexia, mechanism and treatment. **World Journal of Gastrointestinal Oncology**, v.7, n.4, p.17-29, 2015.

ARGILÉS, J. M.; BUSQUETS, S.; STEMMLER, B.; LÓPEZ-SORIANO, F. J. Cancer cachexia: understanding the molecular basis. **Nature Review Cancer**, v.14, n.11, p.754-762, 2014.

ARNOLD, M.; MURA, A.; LANGHANS, W.; GEARY, N. Gut vagal afferents are not necessary for the eating-stimulatory effect of intraperitoneally injected ghrelin in the rat. **Journal of Neuroscience**, v.26, p.11052-11060, 2006.

ARYA, A. K.; HU, B. Brain-gut axis after stroke. **Brain Circulation**, v.4, n.4, p.165-173, 2018.

ATWOOD, B. K.; MACKIE, K. CB2: a cannabinoid receptor with an identity crisis. **British Journal of Pharmacology**, v.160, p.467-479, 2010.

AVERSA, Z.; COSTELLI, P.; MUSCARITOLI, M. Cancer-induced muscle wasting: latest findings in prevention and treatment. **Therapeutic Advances in Medical Oncology**, v.9, n.5, p.369-382, 2017.

BAI, Y.; ZHAO, Y. H.; XU, J. Y.; YU, X. Z.; HU, Y. X.; ZHAO, Z. Q. Atractylodin Induces Myosin Light Chain Phosphorylation and Promotes Gastric Emptying through Ghrelin Receptor. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine: eCAM**, 2186798, 2017.

BECKER, J. B.; PRENDERGAST, B. J.; LIANG, J. W. Female rats are not more variable than male rats: a meta-analysis of neuroscience studies. **Biology of Sex Differences**, v.7, n.34, 2016.

BERNARD, M.; DEJOS, C.; BERGES, T.; REGNACQ, M.; VOISIN, P. Activation of rhodopsin gene transcription in cultured retinal precursors of chicken embryo: Role of Ca(2+) signaling and hyperpolarization-activated cation channels. **Journal of Neurochemistry**, v.129, p.85-98, 2014.

BERTRAND, P. P.; BERTRAND, R. L. Serotonin release and uptake in the gastrointestinal tract. **Autonomic Neuroscience**, v.153, p.47-57, 2010.

BINDELS, L. B.; BINDELS, L. B.; NEYRINCK, A. M.; CLAUS, S. P.; LE ROY, C. I.; GRANGETTE, C.; POT, B.; MARTINEZ, I.; WALTER, J.; CANI, P. D.; DELZENNE, N. M. Synbiotic approach restores intestinal homeostasis and prolongs survival in leukaemic mice with cachexia. **ISME Journal – International Society for Microbial Ecology**, v.10, n.6, p.1456–1470, 2016.

BINDELS, L. B.; DELZENNE, N. M. Muscle wasting: the gut microbiota as a new therapeutic target? **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.45, n.10, p.2186–2190, 2013.

BINDELS, L. B.; NEYRINCK, A. M.; LOUMAYE, A.; CATRY, E.; WALGRAVE, H.; CHERBUY, C.; LECLERCQ, S.; VAN HUL, M.; PLOVIER, H.; PACHIKIAN, B.; BERMÚDEZ-HUMARÁN, L. G.; LANGELLA, P.; CANI, P. D.; THISSEN, J. P.; DELZENNE, N. M. Increased gut permeability in cancer cachexia: mechanisms and clinical relevance. **Oncotarget**, v.9, n.26, p.18224–18238, 2018.

BOCKERSTETT, K. A.; DIPAOLO, R. J. Regulation of Gastric Carcinogenesis by Inflammatory Cytokines. **Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology**, v.4, n.1, p.47–53, 2017.

BONETTO, A.; PENNA, F.; MINERO, V. G.; REFFO, P.; BONELLI, G.; BACCINO, F. M.; COSTELLI, P. Deacetylase inhibitors modulate the myostatin/follistatin axis without improving cachexia in tumor-bearing mice. **Current Cancer Drug Targets**, v.9, n.5, p.608–616, 2009.

BONETTO, A.; RUPERT, J. E.; BARRETO, R.; ZIMMERS, T. A. The Colon-26 Carcinoma Tumor-bearing Mouse as a Model for the Study of Cancer Cachexia. **Journal of Visualized Experiments : JoVE**, v.117, 2016.

BORNER, T.; ARNOLD, M.; RUUD, J.; BREIT, S. N.; LANGHANS, W.; LUTZ, T. A., BLOMQVIST, A.; RIEDIGER, T. Anorexia-cachexia syndrome in hepatoma tumour-bearing rats requires the area postrema but not vagal afferents and is paralleled by increased MIC-1/GDF15. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v.8, n.3, p.417–427, 2017.

BORNER T.; LOI, L.; PIETRA, C.; GIULIANO, C.; LUTZ, T. A.; RIEDIGER, T. The ghrelin receptor agonist HM01 mimics the neuronal effects of ghrelin in the arcuate nucleus and attenuates anorexia-cachexia syndrome in tumor-bearing rats. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v.311, n.1, p.R89–96, 2016.

BORNSTEIN, J. C. Serotonin in the gut: what does it do? **Frontiers in Neuroscience**, v.6, n.16, 2012.

BOURDEL-MARCHASSON, I.; DIALLO, A.; BELLERA, C.; BLANC-BISSON, C.; DURRIEU, J.; GERMAIN, C.; MATHOULIN-PÉLISSIER, S.; SOUBEYRAN, P.; RAINFRAY, M.; FONCK, M.; DOUSSAU, A. One-year mortality in older patients with cancer: development and external validation of an MNA-based prognostic score. **Plos One**, v.11, n.2, 2016.

BRADLEY, P. P.; PRIEBAT, D. A.; CHRISTENSEN, R. D.; ROTHSTEIN, C. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **Journal of Investigative Dermatology**, v.78, n.3, p.206-209, 1982.

BRITO, M. N.; BRITO, N. A.; BARO, D. J.; SONG, C. K.; BARTNESS, T. J. Differential activation of the sympathetic innervation of adipose tissues by melanocortin receptor stimulation. **Endocrinology**, v.148, p.5339–5347, 2007.

BROGLIO, F.; GOTTERO, C.; VAN KOETSVELD, P.; PRODAM, F.; DESTEFANIS, S.; BENSO, A.; GAUNA, C.; HOFLAND, L.; ARVAT, E.; VAN DER LELY, A. J.; GHIGO, E. Acetylcholine regulates ghrelin secretion in humans. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.89, n.5, p.2429-33, 2004.

BROWNING, K.N.; TRAVAGLI, R.A. Central nervous system control of gastrointestinal motility and secretion and modulation of gastrointestinal functions. **Comprehensive Physiology**, v.4, p.1339–1368, 2014.

BRYANT, L. M.; DANIELS, K. E.; COGNETTI, D. M.; TASSONE, P.; LUGINBUHL, A. J.; CURRY, J. M. Therapeutic Cannabis and Endocannabinoid Signaling System Modulator Use in Otolaryngology Patients. **Laryngoscope Investigative Otolaryngology**, v.3, n.3, p.169-177, 2018.

BÜLBÜL, M.; SINEN, O. Dual autonomic inhibitory action of central Apelin on gastric motor functions in rats. **Autonomic Neuroscience**, v.212, p.17–22, 2018.

BURCKART, K.; BECA, S.; URBAN, R. J.; SHEFFIELD-MOORE, M. Pathogenesis of muscle wasting in cancer cachexia: targeted anabolic and anticatabolic therapies. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, v.13, p.410–416, 2010.

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

BURGSTALLER, J.; WITTEK, T.; SMITH, G. W. Invited review: Abomasal emptying in calves and its potential influence on gastrointestinal disease. **Journal of Dairy Science**, v.100, n.1, p.17–35, 2017.

BURNS, A. J.; GOLDSTEIN, A. M.; NEWGREEN, D.F.; STAMP, L.; SCHAFER, K. H.; METZGER, M.; HOTTA, R.; YOUNG, H. M.; ANDREWS, P. W.; THAPAR, N.; BELKIND-GERSON, J.; BONDURAND, N.; BORNSTEIN, J. C.; CHAN, W. Y.; CHEAH, K.; GERSHON, M. D.; HEUCKEROTH, R. O.; HOFSTRA, R. M.; JUST, L.; KAPUR, R. P.; KING, S. K.; MCCANN, C. J.; NAGY, N.; NGAN, E.; OBERMAYR, F.; PACHNIS, V.; PASRICHA, P. J.; SHAM, M. H.; TAM, P.; VANDEN BERGHE, P. White paper on guidelines concerning enteric nervous system stem cell therapy for enteric neuropathies. **Developmental Biology**, v.417, n.2, p.229–251, 2016.

CAILLET, P.; LIUU, E.; RAYNAUD, S. A; BONNEFOY, M.; GUERIN, O.; BERRUT, G.; LESOURD, B.; JEANDEL, C.; FERRY, M.; ROLLAND, Y.; PAILLAUD, E. Association between cachexia, chemotherapy and outcomes in older patients: A systematic review. **Clinical Nutrition**, p.1-10, 2016.

CAMILLERI, M. Novel therapeutic agents in neurogastroenterology: advances in the past year. **Neurogastroenterol Motility**, v.26, p.1070-8, 2014.

CAMPERI, A.; PIN, F.; COSTAMAGNA, D.; PENNA, F.; MENDUINA, M. L.; AVERSA, Z.; ZIMMERS T.; VERZARO, R.; FITTIPALDI, R.; CARETTI, G.; BACCINO, F. M.; MUSCARITOLI, M.; COSTELLI, P. Vitamin D and VDR in cancer cachexia and muscle regeneration. **Oncotarget**, v.8, n.13, p.21778–21793, 2017.

CASANOVA, M. L.; BLÁZQUEZ, C.; MARTÍNEZ-PALACIO, J.; VILLANUEVA, C.; FERNÁNDEZ-ACEÑERO, M. J.; HUFFMAN, J. W.; JORCANO, J. L.; GUZMÁN, M. Inhibition of skin tumor growth and angiogenesis in vivo by activation of cannabinoid receptors. **The Journal of Clinical Investigation**, v.111, n.1, p.43-50, 2003.

CAVALCANTE, A.; SIQUEIRA, R.; FEITOSA JÚNIOR, V. N.; DE ANDRADE, C. R.; SANTOS, A. A.; SILVA, M. T. B. da. Acute exercise inhibits gastric emptying of liquids in rats: influence of the NO-cGMP pathway. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.51, n.11, 2018.

CHAPMAN, M. J.; DEANE, A. M.; O'CONNOR, S. L.; NGUYEN, N. Q.; FRASER, R. J.; RICHARDS, D. B.; HACQUOIL, K. E.; VASIST JOHNSON, L. S.; BARTON, M. E.; DUKES, G. E. The effect of camicinal (GSK962040), a motilin agonist, on gastric emptying and glucose absorption in feed-intolerant critically ill patients: a randomized, blinded, placebo-controlled, clinical trial. **Critical Care**, v.20, n.232, 2016.

CHEN, J. A.; SPLENSER, A.; GUILLORY, B.; LUO, J.; MENDIRATTA, M.; BELINOVA, B.; HALDER, T.; ZHANG, G.; LI, Y. P.; GARCIA, J. M. Ghrelin prevents tumour- and cisplatin-induced muscle wasting: characterization of multiple mechanisms involved. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v.6, n.2, p.132–143, 2015.

CINOSI, V. Modifications in plasma membrane lipid composition and morphological features of AH-130 hepatoma cells by polyenylphosphatidylcholine in vivo treatment. **Oncology Reports**, v.26, n.1, p.229-35, 2011.

CLARK, A. L.; COATS, A. J. S.; KRUM, H.; KATUS, H. A.; MOHACSI, P.; SALEKIN, D.; SCHULTZ, M. K.; PACKER, M.; ANKER, S. D. Effect of beta-adrenergic blockade with carvedilol on cachexia in severe chronic heart failure: results from the COPERNICUS trial. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v.8, n.4, p.549–556, 2017.

CLAYTON, J. A. Studying both sexes: a guiding principle for biomedicine. **FASEB Journal**, v.30, n.2, p.519–524, 2016.

COLLDÉN, G.; TSCHÖP, M. H.; MÜLLER, T. D. Therapeutic Potential of Targeting the Ghrelin Pathway. **International Journal of Molecular Sciences**, v.18, n.4, 2017.

COPPOLA, J. J.; DISNEY, A. A. Is There a Canonical Cortical Circuit for the Cholinergic System? Anatomical Differences Across Common Model Systems. **Frontiers in Neural Circuits**, v.12, n.8, 2018.

COSTA, B.; COLLEONI, M.; CONTI, S.; TROVATO, A. E.; BIANCHI, M.; SOTGIU, M. L.; GIAGNONI, G. Repeated treatment with the synthetic cannabinoid WIN 55,212-2 reduces

both hyperalgesia and production of pronociceptive mediators in a rat model of neuropathic pain. **British Journal of Pharmacology**, v.141, p.4–8, 2004.

CROCI, T.; MANARA, L.; AUREGGI, G.; GUAGNINI, F.; RINALDI-CARMONA, M.; MAFFRAND, J.-P.; LE FUR, G.; MUKENGE, S.; FERLA, G. *In vitro* functional evidence of neuronal cannabinoid CB₁ receptors in human ileum. **British Journal of Pharmacology**, v.125, n.7, p.1393–1395, 1998.

DAS, K.; SAMANTA, L.; CHAYNE, G. B. D. A modified spectrophotometric assay of superoxide dismutase using nitrite formation by superoxide radicals. **Indian Journal of Biochemistry and Biophysics**, v.37, p.201-204, 2000.

DATE, Y.; MURAKAMI, N.; TOSHINAI, K.; MATSUKURA, S.; NIJIMA, A.; MATSUO, H.; KANGAWA, K.; NAKAZATO, M. The role of the gastric afferent vagal nerve in ghrelin-induced feeding and growth hormone secretion in rats. **Gastroenterology**, v.123, p.1120–1128, 2002.

DAVENPORT, A. P.; BONNER, T. I.; FOORD, S. M.; HARMAR, A. J.; NEUBIG, R. R.; PIN, J. P.; SPEDDING, M.; KOJIMA, M.; KANGAWA, K. International Union of Pharmacology. LVI. Ghrelin receptor nomenclature, distribution, and function. **Pharmacological Reviews**, v.57, n.4, p.541–546, 2005.

DAVIS, J. Hunger, ghrelin and the gut. **Brain Research**, v.1693, p.154–158, 2018.

DE GODOY, M. A.; RATTAN, S. Role of rho kinase in the functional and dysfunctional tonic smooth muscles. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.32, p.384–393, 2011.

DE LA COUR, C. D.; NORLÉN, P.; HÅKANSON, R. Secretion of ghrelin from rat stomach ghrelin cells in response to local microinfusion of candidate messenger compounds: a microdialysis study. **Regulatory Peptides**, v.143, p.118–126, 2007.

DEIBERT, D. C.; DEFRONZO, R. A. Epinephrine-induced insulin resistance in man. **Journal of Clinical Investigation**, v.65, p.717–721, 1980.

DEV, R.; DEL FABBRO, E.; SCHWARTZ, G. G.; HUI, D.; PALLA, S. L.; GUTIERREZ, N.; BRUERA, E. Preliminary report: vitamin D deficiency in advanced cancer patients with symptoms of fatigue or anorexia. **Oncologist**, v.16, n.11, p.1637–1641, 2011.

DICK, J. M. C.; VAN GELDRE, L. A.; TIMMERMANS, J. P.; LEFEBVRE, R. A. Investigation of the interaction between nitric oxide and vasoactive intestinal polypeptide in the guinea-pig gastric fundus. **British Journal of Pharmacology**, v.129, n.4, p.751–763, 2000.

DIEGELMANN, J.; OLSZAK, T.; GOKE, B. A novel role for interleukin-27 (IL-27) as mediator of intestinal epithelial barrier protection mediated via differential signal transducer and activator of transcription (STAT) protein signaling and induction of antibacterial and anti-inflammatory proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v.287, p.286–298, 2012.

DIFRANCESCO, J. C.; DIFRANCESCO, D. Dysfunctional HCN ion channels in neurological diseases. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v.6, n.174, 2015.

DI SEBASTIANO, K. M.; YANG, L.; ZBUK, K.; WONG, R. K.; CHOW, T.; KOFF, D.; MORAN, G. R.; MOURTZAKIS, M. Accelerated muscle and adipose tissue loss may predict survival in pancreatic cancer patients: the relationship with diabetes and anaemia. **British Journal of Nutrition**, v.109, n.2, p.302–312, 2013.

DIXON, K. D.; WILLIAMS, F. E.; WIGGINS, R. L.; PAVELKA, J.; LUCENTE, J.; BELLINGER, L. L.; GIETZEN, D. W. Differential effects of selective vagotomy and tropisetron in aminoprivic feeding. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v.279, n.3, p.R997–R1009, 2000.

DOCKRAY, G. J. Gastrointestinal hormones and the dialogue between gut and brain. **Journal of Physiology**, v.592, n.14, p.2927–2941, 2014.

DONG, C. X.; BRUBAKER, P. L. Ghrelin, the proglucagon-derived peptides and peptide YY in nutrient homeostasis. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v.9, n.12, p.705–715, 2012.

DOROSTKAR, M. M.; BOEHM, S. Presynaptic Ionotropic receptors, in **Pharmacology of Neurotransmitter Release**. Handbook of Experimental Pharmacology, eds. SÜDHOF, T. C.; STARKE, K. editors. (Berlin, Heidelberg: Springer), p.479–527, 2008.

DOS SANTOS, V. V.; RODRIGUES, A. L.; DE LIMA, T. C.; DE BARIOGLIO, S. R.; RAISMAN-VOZARI, R.; PREDIGER, R. D. Ghrelin as a Neuroprotective and Palliative Agent in Alzheimer's and Parkinson's Disease. **Current Pharmaceutical Design**, v.19, p.6773–6790, 2013.

DZUTSEV, A.; BADGER, J. H.; PEREZ-CHANONA, E.; ROY, S.; SALCEDO, R.; SMITH, C. K.; TRINCHIERI, G. Microbes and Cancer. **Annual Review of Immunology**, v.35, p.199–228, 2017.

EL-ALFY, W.; ISMAIEL, O. A.; EL-MAMMLI, M. Y.; SHALABY, A. Determination of Atenolol and Trimetazidine in Pharmaceutical Tablets and Human Urine Using a High Performance Liquid Chromatography-Photo Diode Array Detection Method. **International Journal of Analytical Chemistry**, 9625849, 2019.

ELBADAWY, M.; SASAKI, K.; MIYAZAKI, Y.; ABOUBAKR, M.; KHALIL, W. F.; SHIMODA, M. Oral pharmacokinetics of acetaminophen to evaluate gastric emptying profiles of Shiba goats. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v.77, n.10, p.1331-4, 2015.

ENGELN, M. P. K. J.; VAN DER MEIJ, B. S.; DEUTZ, N. E. P. Protein anabolic resistance in cancer: Does it really exist? **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, v.19, n.1, p. 39–47, 2016.

ENGELSTOFT, M. S.; PARK, W. M.; SAKATA I.; KRISTENSEN L.V.; HUSTED A.S.; OSBORNE-LAWRENCE S.; PIPER, P. K.; WALKER, A. K.; PEDERSEN, M. H.; NØHR, M. K.; PAN, J.; SINZ, C. J.; CARRINGTON, P. E.; AKIYAMA, T. E.; JONES, R. M.; TANG, C.; AHMED, K.; OFFERMANN, S.; EGEROD, K. L.; ZIGMAN, J. M.; SCHWARTZ, T. W. Seven transmembrane G protein-coupled receptor repertoire of gastric ghrelin cells. **Molecular Metabolism**, v.2, p.376–392, 2013.

FANG, X.; TANG, W.; SUN, S.; HUANG, L.; CHANG, Y.-T.; CASTILLO, C. Weil, M. H. Comparison of buccal microcirculation between septic and hemorrhagic shock. **Critical Care Medicine**, v.34, p.S447–S453, 2006.

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

FEARON, K.; STRASSER, F.; ANKER, S. D.; BOSAEUS, I.; BRUERA, E.; FAINSINGER, R. L.; JATOI, A.; LOPRINZI, C.; MACDONALD, N.; MANTOVANI, G.; DAVIS, M.; MUSCARITOLI, M.; OTTERY, F.; RADBRUCH, L.; RAVASCO, P.; WALSH, D.; WILCOCK, A.; KAASA, S.; BARACOS, V. E. Definition and classification of cancer cachexia: an international consensus. **The Lancet Oncology**, v.12, p.489–495, 2011.

FERNANDÉZ, I.; PEÑA, A.; TESO, N. D.; PÉREZ, V.; RODRÍGUEZ-CUESTA, J. Clinical Biochemistry Parameters in C57BL/6J Mice after Blood Collection from the Submandibular Vein and Retroorbital Plexus. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS**, v.49, n.2, p.202–206, 2010.

FONTES-OLIVEIRA, C. C.; BUSQUETS, S.; TOLEDO, M.; PENNA, F.; AYLWIN, M. P.; SIRISI, S.; SILVA, A. P.; ORPÍ, M.; GARCÍA, A.; SETTE, A.; INÊS GENOVESE, M.; OLIVAN, M.; LÓPEZ-SORIANO, F. J.; ARGILÉS, J. M. Mitochondrial and sarcoplasmic reticulum abnormalities in cancer cachexia: Altered energetic efficiency? **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v.1830, n.3, p.2770–2778, 2013.

FOX, E. A.; BIDDINGER, J. E. Early postnatal overnutrition: potential roles of gastrointestinal vagal 441 afferents and brain-derived neurotrophic factor. **Physiology & Behavior**, v.106, n.3, p.400–12, 2012.

FRACARO, L.; FREZ, F. C. V.; SILVA, B. C.; VICENTINI, G. E.; DE SOUZA, S. R. G.; MARTINS, H. A.; LINDEN, D. R.; GUARNIER, F. A.; ZANONI, J. N. Walker 256 tumor-bearing rats demonstrate altered interstitial cells of Cajal Effects on ICC in the Walker 256 tumor model. **Neurogastroenterology and Motility : The Official Journal of the European Gastrointestinal Motility Society**, v.28, n.1, p.101–115, 2016.

FUJITSUKA, N.; ASAKAWA, A.; AMITANI, H.; FUJIMIYA, M.; INUI, A. Ghrelin and Gastrointestinal Movement. **Ghrelin**, p.289–301, 2012.

FUJITSUKA, N.; ASAKAWA, A.; UEZONO, Y.; MINAMI, K.; YAMAGUCHI, T.; NIJIMA, A.; YADA, T.; MAEJIMA, Y.; SEDBAZAR, U.; SAKAI, T.; HATTORI, T.; KASE, Y.; INUI, A. Potentiation of ghrelin signaling attenuates cancer anorexia-cachexia and prolongs survival. **Translational Psychiatry**, v.1, n.7, 2011.

FUJITSUKA, N.; UEZONO, Y. Rikkunshito, a ghrelin potentiator, ameliorates anorexia–cachexia syndrome. **Frontiers in Pharmacology**, v.5, n.271, 2014.

FURNESS, J. B.; CALLAGHAN, B. P.; RIVERA, L. R.; CHO, H. J. The enteric nervous system and gastrointestinal innervation: integrated local and central control. **Advances in Experimental and Medicine Biology**, v.817, p.39–71, 2014.

FURNESS, J. B. Integrated Neural and Endocrine Control of Gastrointestinal Function. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.891, p.159–173, 2016.

GABELLA, G. Detection of nerve cells by a histochemical technique. **Experientia**, v.25, p.218-219, 1969.

GAGNON, J.; ANINI, Y. Glucagon stimulates ghrelin secretion through the activation of MAPK and EPAC and potentiates the effect of norepinephrine. **Endocrinology**, v.154, n.2, p.666–674, 2013.

GAGNON J.; ANINI, Y. Insulin and norepinephrine regulate ghrelin secretion from a rat primary stomach cell culture. **Endocrinology**, v.153, p.3646–3656, 2012.

GAUTAM, D.; JEON, J.; STAROST, M. F.; HAN, S. J.; HAMDAN, F. F.; CUI, Y.; PARLOW, A. F.; GAVRILOVA, O.; SZALAYOVA, I.; MEZEY, E.; WESS, J. Neuronal M₃ muscarinic acetylcholine receptors are essential for somatotroph proliferation and normal somatic growth. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.106, n.15, p.6398–6403, 2009.

GFROERER, F.; ROLE, U. Interstitial cells of Cajal in the normal human gut and in Hirschsprung disease. **Pediatric Surgery International**, v.29, n.9, p.899–97, 2013.

GODLEWSKI J. Morphological changes in the enteric nervous system caused by carcinoma of the human large intestine. **Folia Histochemica et Cytobiologica / Polish Academy of Sciences, Polish Histochemical and Cytochemical Society**, v.48, n.1, p.157–62, 2010.

GOLDSTEIN, J. L.; ZHAO, T. J.; LI, R. L.; SHERBET, D. P.; LIANG, G.; BROWN, M. S. Surviving starvation: essential role of the ghrelin-growth hormone axis. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v.76, p.121–127, 2011.

GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v.126, p.131-138, 1982.

GUAN, Z. Cross-talk between oxidative stress and modifications of cholinergic and glutaminergic receptors in the pathogenesis of Alzheimer's disease. **Acta Pharmacologica Sinica**, v.29, n.7, p.773–780, 2008.

GUAN, Z.-Z.; ZHANG, X.; MOUSAVI, M.; TIAN, J.-Y.; UNGER, C.; NORDBERG, A. Reduced expression of neuronal nicotinic acetylcholine receptors during the early stages of damage by oxidative stress in PC12 cells. **Journal of Neuroscience Research**, v.66, n.4, p.551–558, 2001.

GUARINO, D.; NANNIPIERI, M.; IERVASI, G.; TADDEI, S.; BRUNO, R. M. The Role of the Autonomic Nervous System in the Pathophysiology of Obesity. **Frontiers in Physiology**, v.8, n.665, 2017.

GUARNIER, F. A.; CECCHINI, A. L.; SUZUKAWA, A. A.; MARAGNO, A. L.; SIMÃO, A. N.; GOMES, M. D.; CECCHINI, R. Time course of skeletal muscle loss and oxidative stress in rats with Walker 256 solid tumor. **Muscle Nerve**, v.42, n.6, p.950-958, 2010.

HACKSELL, U.; NASH, N.; BURSTEIN, E. S.; PIU, F.; CROSTON, G.; BRANN, M. R. Chemical genomics: massively parallel technologies for rapid lead identification and target validation. **Cytotechnology**, v.38, n.1-3, p.3-10, 2002.

HALD, A.; DING, M.; EGEROD, K.; HANSEN, R. R.; KONRADSEN, D.; JØRGENSEN, S. G.; ATALAY, B.; NASSER, A.; BJERRUM, O.J.; HEEGAARD, A. M. Differential effects of repeated low dose treatment with the cannabinoid agonist WIN 55,212-2 in experimental models of bone cancer pain and neuropathic pain. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.91, n.1, p.38-46, 2008.

HATTER, J. A.; KOUICHE, Y. M.; MELCHOR, S. J.; NG, K.; BOULEY, D. M.; BOOTHROYD, J. C.; EWALD, S. E. Toxoplasma gondii infection triggers chronic cachexia and sustained commensal dysbiosis in mice. **Plos One**, v.13, n.10, e0204895, 2018.

HEADING, R. C.; NIMMO, J.; PRESCOTT, L.F.; TOTHILL, P. The dependence of paracetamol absorption on the rate of gastric emptying. **British Journal of Pharmacology**, v.47, p.415-421, 1973.

HE, L.; TAO, J.; MAITY, D.; SI, F.; WU, Y.; WU, T.; PRASATH, V.; WIRTZ, D.; SUN, S. X. Role of membrane-tension gated Ca^{2+} flux in cell mechanosensation. **Journal of Cell Science**, v.131, n.4, jcs208470, 2018.

HENS, B.; CORSETTI, M.; SPILLER, R.; MARCIANI, L.; VANUYTSEL, T.; TACK, J.; TALATTOF, A.; AMIDON, G. L.; KOZIOLEK, M.; WEITSCHIES, W.; WILSON, C. G.; BENNINK, R. J.; BROUWERS, J.; AUGUSTIJNS, P. Exploring gastrointestinal variables affecting drug and formulation behavior: Methodologies, challenges and opportunities. **International Journal of Pharmaceutics**, v.519, n.1-2, p.79-97, 2017.

HENZE, L. J.; GRIFFIN, B. T.; CHRISTIANSEN, M.; BUNDGAARD, C.; LANGGUTH, P.; HOLM, R. Exploring gastric emptying rate in minipigs: Effect of food type and pre-dosing of metoclopramide. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, 118, 183-190, 2018.

HEPPNER, K. M.; PIECHOWSKI, C. L.; MULLER, A.; OTTAWAY, N.; SISLEY, S.; SMILEY, D. L.; HABEGGER, K. M.; PFLUGER, P. T.; DIMARCHI, R.; BIEBERMANN, H.; TSCHÖP, M. H.; SANDOVAL, D. A.; PEREZ-TILVE, D. Both acyl and des-acyl ghrelin regulate adiposity and glucose metabolism via central nervous system ghrelin receptors. **Diabetes**, v.63, n.1, p.122-131, 2014.

HERLIHY, J. T.; SEMENOV, I.; BRENNER, R. Assessment of airway hyperresponsiveness in murine tracheal rings. **Methods in Molecular Biology**, v.1032, p. 257-269, 2013.

HODGMAN, M. J.; GARRARD, A. R. A Review of Acetaminophen Poisoning. **Critical Care Clinics**, v.28, n.4, p.499-516, 2012.

HOLWERDA, A. M.; LENAERTS, K.; BIERAU, J.; VAN LOON, L. J. C. Body Position Modulates Gastric Emptying and Affects the Post-Prandial Rise in Plasma Amino Acid Concentrations Following Protein Ingestion in Humans. **Nutrients**, v.8, n.4, 2016.

HORN, H.; BÖHME, B.; DIETRICH, L.; KOCH, M. Endocannabinoids in body weight control. **Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)**, v.11, n.2, 55, 2018.

HORVATHOVA, L.; MRAVEC, B. Effect of the autonomic nervous system on cancer progression depends on the type of tumor: solid are more affected than ascitic tumors. **Endocrine Regulations**, v.50, n.4, p.215–224, 2016.

HORVATHOVA, L.; TILLINGER, A.; SIVAKOVA, I.; MIKOVA, L.; MRAVEC, B.; BUCOVA, M. Chemical sympathectomy increases neutrophil-to-lymphocyte ratio in tumor-bearing rats but does not influence cancer progression. **Journal of Neuroimmunology**, v.278, p.255–261, 2015.

HOSODA, H.; KANGAWA, K. The autonomic nervous system regulates gastric ghrelin secretion in rats. **Regulatory Peptides**, v.146, p.12–18, 2008.

HU, W.; MAHAVADI, S.; LI, F.; MURTHY, K. S. Up-regulation of RGS4 and down-regulation of CPI-17 mediate inhibition of colonic muscle contraction by interleukin-1 beta. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v.293, n.6, p.C1991–2000, 2007.

HU, X.; WANG, J.; ZHANG, Q.; DUAN, X.; CHEN, Z.; ZHANG, Y. Postconditioning with sevoflurane ameliorates spatial learning and memory deficit after hemorrhage shock and resuscitation in rats. **Journal of Surgical Research**, v.206, n.2, p.307–315, 2016.

HU, X.; YANG, Z.; YANG, M.; QIAN, J.; CAHOON, J.; XU, J.; SUN, S.; TANG, W. Remote ischemic preconditioning mitigates myocardial and neurological dysfunction via K(ATP) channel activation in a rat model of hemorrhagic shock. **Shock**, v.42, n.3, p.228–233, 2014.

HYLTANDER, A.; DANERYD, P.; SANDSTROM, R.; KORNER, U.; LUNDHOLM, K. Beta-adrenoceptor activity and resting energy metabolism in weight losing cancer patients. **European Journal of Cancer**, v.36, p.330–334, 2000.

IWAKURA, H.; ARIYASU, H.; HOSODA, H.; YAMADA, G.; HOSODA, K.; NAKAO, K.; KANGAWA, K.; AKAMIZU, T. Oxytocin and dopamine stimulate ghrelin secretion by the ghrelin-producing cell line, MGN3-1 in vitro. **Endocrinology**, v.152, p.2619–2625, 2011.

IWATA, Y.; SUZUKI, N.; OHTAKE, H.; KAMAUCHI, S.; HASHIMOTO, N.; KIYONO, T.; WAKABAYASHI, S. Cancer cachexia causes skeletal muscle damage via transient receptor potential vanilloid 2-independent mechanisms, unlike muscular dystrophy. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v.7, p.366–376, 2016.

IZZO, A. A.; SHARKEY, K. A. Cannabinoids and the gut: new developments and emerging concepts. **Pharmacology & Therapeutics**, v.126, p.21–38, 2010.

JIANG, Y.; LI, Y. R.; TIAN, H.; MA, M.; MATSUNAMI, H. Muscarinic acetylcholine receptor M3 modulates odorant receptor activity via inhibition of beta-arrestin-2 recruitment. **Nature Communications**, v.6, n.6448, 2015.

JOHANSSON, C.; EKELUND, K. Effects of 16,16-dimethyl prostaglandin E2 on the integrated response to a meal. In: HL Duthie, ed. *Gastrointestinal motility in health and disease*. MTP Press Ltd, **Lancaster**, p.195–202, 1978.

JOHNSON, T. N.; BONNER, J. J.; TUCKER, G. T.; TURNER, D. B.; JAMEI, M. Development and applications of a physiologically-based model of paediatric oral drug absorption. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, 115, 57–67, 2018.

JOHNSTON, A. J.; MURPHY, K. T.; JENKINSON, L.; LAINE, D.; EMMRICH, K.; FAOU, P.; WESTON, R.; JAYATILLEKE, K. M.; SCHLOEGEL, J.; TALBO, G.; CASEY, J. L.; LEVINA, V.; WONG, W. W.; DILLON, H.; SAHAY, T.; HOOGENRAAD, J.; ANDERTON, H.; HALL, C.; SCHNEIDER, P.; TANZER, M.; FOLEY, M.; SCOTT, A. M.; GREGOREVIC, P.; LIU, S. Y.; BURKLY, L. C.; LYNCH, G. S.; SILKE, J.; HOOGENRAAD, N. J. Targeting of Fn14 Prevents Cancer-Induced Cachexia and Prolongs Survival. **Cell**, v.162, n.6, p.1365-78, 2015.

JÓZWIAK-BEBENISTA, M.; NOWAK, J. Z. Paracetamol: mechanism of action, applications and safety concern. **Acta Poloniae Pharmaceutica**, v.71, n.1, p.11-23, 2014.

KALANTAR-ZADEH, K.; RHEE, C.; SIM, J. J.; STENVINKEL, P.; ANKER, S. D.; KOVESDY, C. P. Why cachexia kills: examining the causality of poor outcomes in wasting conditions. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v.4, n.2, p.89–94, 2013.

KALKAN, Ç.; SOYKAN, I. The Relations Among Serum Ghrelin, Motilin and Gastric Emptying and Autonomic Function in Autoimmune Gastritis. **The American Journal of the Medical Sciences**, v.355, n.5, p.428–433, 2018.

KAMM, K. E.; STULL, J. T. The function of myosin and myosin light chain kinase phosphorylation in smooth muscle. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v.25, p.593-620, 1985.

KAMPE, J.; BROWN, W. A.; STEFANIDIS, A.; DIXON, J. B.; OLDFIELD, B. J. A rodent model of adjustable gastric band surgery—implications for the understanding of underlying mechanisms. **Obesity Surgery**, v.19, n.5, p.625–31, 2009.

KATONA, I.; FREUND, T. F. Multiple functions of endocannabinoid signaling in the brain. **Annual Review of Neuroscience**, v.35, p.529–558, 2012.

KAZEMI-BAJESTANI, S. M.; MAZURAK, V. C.; BARACOS, V. Computed tomography-defined muscle and fat wasting are associated with cancer clinical outcomes. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v.54, p.2-10, 2016.

KENYON, J.; LIU, W.; DALGLEISH, A. Report of Objective Clinical Responses of Cancer Patients to Pharmaceutical-grade Synthetic Cannabidiol. **Anticancer Research**, v.38, n.10, p.5831–5835, 2018.

KHAN, M. I.; SOBOCIŃSKA, A. A.; BRODACZEWSKA, K. K.; ZIELNIOK, K.; GAJEWSKA, M.; KIEDA, C.; CZARNECKA, A. M.; SZCZYLIK, C. Involvement of the CB₂ cannabinoid receptor in cell growth inhibition and G₀/G₁ cell cycle arrest via the cannabinoid agonist WIN 55,212-2 in renal cell carcinoma. **BMC Cancer**, v.18, n.1, 583, 2018.

KHAN, M. I.; SOBOCINSKA, A. A.; CZARNECKA, A. M.; KROL, M.; BOTTA, B.; SZCZYLIK, C. The therapeutic aspects of the endocannabinoid system (ECS) for Cancer and

their development: from nature to laboratory. **Current Pharmaceutical Design**, v.22, n.12, p.1756–1766, 2016.

KHATIB, M. N.; GAIDHANE, A.; GAIDHANE, S.; QUAZI, Z. S. Ghrelin as a Promising Therapeutic Option for Cancer Cachexia. **Cellular Physiology and Biochemistry**, p.2172–2188, 2018a.

KHATIB, M. N.; SHANKAR, A.; KIRUBAKARAN, R.; GAIDHANE, A.; GAIDHANE, S.; SIMKHADA, P.; QUAZI, S. Z. Ghrelin for the management of cachexia associated with cancer (Protocol). **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v.2, p.01-50, 2018b.

KIM, H. J.; KIM, J. H.; NOH, S.; HUR, H. J.; SUNG, M. J.; HWANG, J.T.; PARK, J. H.; YANG, H. J.; KIM, M. S.; KWON, D. Y.; YOON, S. H. Metabolomic analysis of livers and serum from high-fat diet induced obese mice. **Journal of Proteome Research**, v.10, p.722–731, 2011.

KIM, R. Y.; RAE, B.; NEAL, R.; DONOVAN, C.; PINKERTON, J.; BALACHANDRAN, L.; STARKEY, M. R.; KNIGHT, D. A.; HORVAT, J. C.; HANSBRO, P. M. Elucidating novel disease mechanisms in severe asthma. **Clinical & Translational Immunology**, v.5, n.7, e91, 2016.

KIR, S.; WHITE, J. P.; KLEINER, S.; KAZAK, L.; COHEN, P.; BARACOS, V. E.; SPIEGELMAN, B. M. Tumour-derived PTHrelated protein triggers adipose tissue browning and cancer cachexia. **Nature**, v.513, n.7516, p.100-4, 2014.

KLEIN, G. L.; PETSCHOW, B. W.; SHAW, A. L.; WEAVER, E. Gut barrier dysfunction and microbial translocation in cancer cachexia: a new therapeutic target. **Current Opinion in Supportive and Palliative Care**, v.7, n.4, p.361–367, 2013a.

KLEIN, S.; SEIDLER, B.; KETTENBERGER, A.; SIBAEV, A.; FEIL, R.; HOFMANN, F.; VANDERWINDEN, J.-M.; ALLESCHER, H.-D.; SCHEMANN, M.; STORR, M. A.; SCHIMID, R. M.; SCHNEIDER, G.; SAUR, D. Interstitial cells of Cajal plasticity rather than regeneration restores slow-wave activity and enteric neurotransmission upon acute damage. **BMC Pharmacology and Toxicology**, v.14, suppl.1, 2013b.

KOJIMA, M.; HOSODA, H.; MATUSUO, H.; KANGAWA, K. Ghrelin: discovery of the natural endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v.12, n.3, p.118–121, 2001.

KONTUREK, S. J.; KONTUREK, J. W.; PAWLIK, T.; BRZOZOWSKI, T. Brain-gut axis and its role in the control of food intake. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v.55, p.137-54, 2004.

KOUTOURATSAS, T.; KALLI, T.; KARAMANOLIS, G.; GAZOULI, M. Contribution of ghrelin to functional gastrointestinal disorders' pathogenesis. **World Journal of Gastroenterology**, v.25, n.5, p.539-551, 2019.

KURNIK, M.; GIL, K.; GAJDA, M.; THOR, P.; BUGAJSKI, A. Neuropathic alterations of the myenteric plexus neurons following subacute intraperitoneal administration of salsolinol.

Folia histochemica et cytobiologica / Polish Academy of Sciences, Polish Histochemical and Cytochemical Society, v.53, n.1, p.49–61, 2015.

LACHOWSKA, K.; GRUCHALA, M.; NARKIEWICZ, K.; HERING, D. Sympathetic activation in chronic heart failure: potential benefits of interventional therapies. **Current Hypertension Reports**, v.18, n.7, 2016.

LAKE, J. I.; HEUCKEROTH, R. O. Enteric nervous system development: migration, differentiation, and disease. **American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology**, v.305, n.1, p.G1–G24, 2013.

LAVIANO, A.; MEGUID, M. M.; PREZIOSA I.; FANELLI F. R. Oxidative stress and wasting in cancer. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**; v.10, n.4, p.449–456, 2007.

LAVIANO, A.; INUI, A.; MARKS, D. L.; MEGUID, M. M.; PICHARD, C.; ROSSI FANELLI, F.; SEELAENDER, M. Neural control of the anorexia-cachexia syndrome. **American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism**, v.295, p.E1000–E1008, 2008.

LEE, H.-M.; WANG, G.; ENGLANDER, E. W.; KOJIMA, M.; GREELEY JR., G. H. Ghrelin, A New Gastrointestinal Endocrine Peptide that Stimulates Insulin Secretion: Enteric Distribution, Ontogeny, Influence of Endocrine, and Dietary Manipulations. **Endocrinology**, v.143, n.1, p.185–190, 2002.

LEMBO, A.; CAMILLERI, M.; MCCALLUM, R.; SASTRE, R.; BRETON, C.; SPENCE, S.; WHITE, J.; CURRIE, M.; GOTTESDIENER, K.; STONER, E. Relamorelin reduces vomiting frequency and severity and accelerates gastric emptying in adults with diabetic gastroparesis. **Gastroenterology**, v.151, n.1, p.87–96, 2016.

LENK, K.; SCHULER, G.; ADAMS, V. Skeletal muscle wasting in cachexia and sarcopenia: molecular pathophysiology and impact of exercise training. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v.1, n.1, p.9–21, 2010.

LERNER, L.; TAO, J.; LIU, Q.; NICOLETTI, R.; FENG, B.; KRIEGER, B.; MAZSA, E.; SIDDIQUEE, Z.; WANG, R.; HUANG, L.; SHEN, L.; LIN, J.; VIGANO, A.; CHIU, M. I.; WENG, Z.; WINSTON, W.; WEILER, S.; GYURIS, J. MAP3K11/GDF15 axis is a critical driver of cancer cachexia. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v.7, n.4, p.467–482, 2016.

LEVITT, D. G. Quantitation of small intestinal permeability during normal human drug absorption. **BMC Pharmacology & Toxicology**, v.14, n.34, 2013.

LI, J.; KONG, D.; HE, Y.; WANG, X.; GAO, L.; LI, J.; YAN, M.; LIU, D.; WANG, Y.; ZHANG, L.; JIN, X. The impact of inflammatory cells in malignant ascites on small intestinal ICCs' morphology and function. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v.19, n.9, p.2118–2127, 2015a.

LI, X. D.; SUN, G. F.; ZHU, W. B.; WANG, Y. H. Effects of high intensity exhaustive exercise on SOD, MDA, and NO levels in rats with knee osteoarthritis. **Genetic and Molecular Research**, v.14, p.12367–12376, 2015b.

LIU, N.; ABELL, T. Gastroparesis Updates on Pathogenesis and Management. **Gut and Liver**, v.11, n.5, p.579–589, 2017.

LLORENTE-OVEJERO, A.; MANUEL, I.; LOMBARDELO, L.; GIRALT, M. T.; LEDENT, C.; GIMÉNEZ-LLORT, L.; RODRÍGUEZ-PUERTAS, R. Endocannabinoid and Muscarinic Signaling Crosstalk in the 3xTg-AD Mouse Model of Alzheimer's Disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, v.64, n.1, p.117–136, 2018.

LU, H. H.; THOMAS, J. D.; TUKKER, J. J.; FLEISHER, D. Intestinal Water and Solute Absorption Studies: Comparison of in Situ Perfusion with Chronic Isolated Loops in Rats. **Pharmaceutical Research**, v.9, n.7, p.894-900, 1992.

LU, K.-H.; CAO, J.; OLESON, S.; WARD, M. P.; PHILLIPS, R. J.; POWLEY, T. L.; LIU, Z. Vagus nerve stimulation promotes gastric emptying by increasing pyloric opening measured with magnetic resonance imaging. **Neurogastroenterology & Motility**, e13380, 2018.

LUNDGREN, O. Sympathetic input into the enteric nervous system. **Gut**, v.47, p.33–35, 2000.

MACCARRONE, M.; BAB, I.; BÍRÓ, T.; CABRAL, G. A.; DEY, S. K.; DI MARZO, V.; KONJE, J. C.; KUNOS, G.; MECHOULAM, R.; PACHER, P.; SHARKEY, K. A.; ZIMMER, A. Endocannabinoid signaling at the periphery: 50 years after THC. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.36, n.5, p.277–296, 2015.

MAGALHÃES, P. J. C.; CRIDDLE, D. N.; TAVARES, R. A.; MELO, E. M.; MOTA, T. L.; LEAL-CARDOSO, J. H. Intestinal myorelaxant and antispasmodic effects of the essential oil of *Croton nepetaefolius* and its constituents cineole, methyl-eugenol and terpineol. **Phytotherapy Research**, v.12, n.3, p.172–177, 1998.

MAHAVADI, S.; NALLI, A. D.; WANG, H.; KENDIG, D. M.; CROWE, M. S.; LYALL, V.; GRIDER, J. R.; MURTHY, K. S. Regulation of gastric smooth muscle contraction via Ca^{2+} -dependent and Ca^{2+} -independent actin polymerization. **Plos One**, v.13, n.12, e0209359, 2018.

MANI, B. K.; OSBORNE-LAWRENCE, S.; VIJAYARAGHAVAN, P.; HEPLER, C.; ZIGMAN, J. M. β 1-Adrenergic receptor deficiency in ghrelin-expressing cells causes hypoglycemia in susceptible individuals. **Journal of Clinical Investigation**, v.126, p.3467–3478, 2016.

MARD, S. A.; AHMADI, I.; AHANGARPOUR, A.; GHARIB-NASERI, M. K.; BADA VI, M. Delayed gastric emptying in diabetic rats caused by decreased expression of cystathionine gamma lyase and H_2S synthesis: *in vitro* and *in vivo* studies. **Neurogastroenterology & Motility**, v.28, n.11, p.1677-1689, 2016.

MARIN, T. M.; DE CARVALHO INDOLFO, N.; ROCCO, S. A.; BASEI, F. L.; DE CARVALHO, M.; DE ALMEIDA GONÇALVES, K.; PAGANI, E. Acetaminophen absorption and metabolism in an intestine/liver microphysiological system. **Chemico-Biological Interactions**, 2018.

MARTINEZ, E. E.; PEREIRA, L. M.; GURA, K.; STENQUIST, N.; ARIAGNO, K.; NURKO, S.; MEHTA, N. M. Gastric Emptying in Critically Ill Children. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v.41, n.7, p.1100–1109, 2017.

MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, E.; GÓMEZ, I.; MARTÍN, P.; SÁNCHEZ, A.; ROMÁN, L.; TEJERINA, E.; BONILLA, F.; MERINO, A. G.; DE HERREROS, A. G.; PROVENCIO, M., GARCÍA, J. M. Cannabinoids receptor type 2, CB2, expression correlates with human colon cancer progression and predicts patient survival. **Oncoscience**, v.2, n.2, p.131-41, 2015.

MARTIN, L.; SENESSE, P.; GIOULBASANIS, I.; ANTOUN, S.; BOZZETTI, F.; DEANS, C.; STRASSER, F.; THORESEN, L.; JAGOE, R. T.; CHASEN, M.; LUNDHOLM, K.; BOSAEUS, I.; FEARON, K. H.; BARACOS, V. E. Diagnostic criteria for the classification of Cancer-associated weight loss. **Journal of Clinical Oncology**, v.33, n.1, p.90–99, 2015.

MARTINS, H. A.; BAZOTTE, R. B.; VICENTINI, G. E.; LIMA, M. M.; GUARNIER, F. A.; HERMES-ULIANA, C.; FREZ, F. C.; BOSSOLANI, G. D.; FRACARO, L.; FÁVARO, L. D.; MANZANO, M. I.; ZANONI, J. N. l-Glutamine supplementation promotes an improved energetic balance in Walker-256 tumor-bearing rats. **Tumor Biology**, v.39, n.3, 2017.

MARZÁBAL, M.; GARCÍA-MARTÍNEZ, C.; COMAS, J.; LÓPEZ-SORIANO, F. J.; ARGILÉS, J. M. A flow cytometric study of the rat Yoshida AH-130 ascites hepatoma. **Cancer Letters**, v.72, p.169-173, 1993.

MARZO, V. D.; BIFULCO, M.; PETROCELLIS, L. D. The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. **Nature Reviews Drug Discovery**, v.3, n.9, p.771–84, 2004.

MARZUILLO, P.; GUARINO, S.; BARBI, E. Paracetamol: a focus for the general pediatrician. **European Journal of Pediatrics**, v.173, n.4, p.415-25, 2014.

MASTROCOLA, R.; REFFO, P.; PENNA, F.; TOMASINELLI, C. E.; BOCCUZZI, G.; BACCINO, F. M.; ARAGNO, M.; COSTELLI, P. Muscle wasting in diabetic and in tumor-bearing rats: role of oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v.44, n.4, p.584-93, 2008.

MCCLAIN, J. L.; GRUBIŠIĆ, V.; FRIED, D.; GOMEZ-SUAREZ, R. A.; LEINNINGER, G. M.; SÉVIGNY, J.; PARPURA, V.; GULBRANSEN, B. D. Ca^{2+} responses in enteric glia are mediated by connexin-43 hemichannels and modulate colonic transit in mice. **Gastroenterology**, v.146, n.2, p.497–507, 2014.

MCVEY NEUFELD, K. A.; MAO, Y.K.; BIENENSTOCK, J.; FOSTER, J. A.; KUNZE, W. A. The microbiome is essential for normal gut intrinsic primary afferent neuron excitability in the mouse. **Neurogastroenterology and Motility**, v.25, n.2, p.183–e88, 2013.

METSUGI, Y.; MIYAJI, Y.; OGAWARA, K.; HIGAKI, K.; KIMURA, T. Appearance of double peaks in plasma concentration-time profile after oral administration depends on gastric emptying profile and weight function. **Pharmaceutical Research**, v.25, p.886-895, 2008.

MICHAELIS, K. A.; ZHU, X.; BURFEIND, K. G.; KRASNOW, S. M.; LEVASSEUR, P. R.; MORGAN, T. K.; MARKS, D. L. Establishment and characterization of a novel murine model of pancreatic cancer cachexia. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v.8, n.5, p.824–838, 2017.

MINERO, V. G.; DE STEFANIS, D.; COSTELLI, P.; BACCINO, F. M.; BONELLI, G. In vitro and in vivo conditional sensitization of hepatocellular carcinoma cells to TNF-induced apoptosis by taxol. **Cell Cycle (Georgetown, Texas)**, v.14, n.7, p.1090-102, 2015.

MIYANO, Y.; SAKATA, I.; KURODA, K.; AIZAWA, S.; TANAKA, T.; JOGAHARA, T.; KUROTANI, R.; SAKAI, T. The Role of the Vagus Nerve in the Migrating Motor Complex and Ghrelin- and Motilin-Induced Gastric Contraction in Suncus. **Plos One**, v.8, n.5, e64777, 2013.

MOLFINO, A.; GIOIA, G.; MUSCARITOLI, M. The hunger hormone ghrelin in cachexia. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v.13, p.465-468, 2013.

MOLFINO, A.; GIOIA, G.; ROSSI FANELLI, F.; LAVIANO, A. Contribution of Neuroinflammation to the Pathogenesis of Cancer Cachexia. **Mediators of Inflammation**, 801685, 2015.

MOLFINO, A.; PAPA, A.; GASPERINI-ZACCO, M. L.; MUSCARITOLI, M.; AMOROSO, A.; CASCINO, A.; CATALANO, C.; ALBANESE, C. V.; LAVIANO, A. Left ventricular mass correlates with lean body mass in patients with disease-associated wasting. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v.5, n.3, p.251–252, 2014.

MONDAL, A.; AIZAWA, S.; SAKATA, I.; GOSWAMI, C.; ODA, S.; SAKAI, T. Mechanism of Ghrelin-Induced Gastric Contractions in Suncus murinus (House Musk Shrew): Involvement of Intrinsic Primary Afferent Neurons. **Plos One**, v.8, n.4, e60365, 2013.

MOORE-CARRASCO, R.; BUSQUETS, S.; FIGUERAS, M.; PALANKI, M.; LÓPEZ-SORIANO, F. J.; ARGILÉS, J. M. Both AP-1 and NF-kappaB seem to be involved in tumour growth in an experimental rat hepatoma. **Anticancer Research**, v.29, n.4, p.1315-7, 2009.

MORDES, J. P.; HERRERA, M. G.; SILEN, W. Decreased Weight Gain and Food Intake in Vagotomized Rats. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v.156, p.257-260, 1977.

MUKHOPADHYAY, B.; SCHUEBEL, K.; MUKHOPADHYAY, P.; CINAR, R.; GODLEWSKI, G.; XIONG, K.; MACKIE, K.; LIZAK, M.; YUAN, Q.; GOLDMAN, D.; KUNOS, G. Cannabinoid receptor 1 promotes hepatocellular carcinoma initiation and progression through multiple mechanisms. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v.61, n.5, p.1615-26, 2015.

MÜLLER, T. D.; NOGUEIRAS, R.; ANDERMANN, M. L.; ANDREWS, Z. B., ANKER, S. D.; ARGENTE, J.; TSCHÖP, M. H. Ghrelin. **Molecular Metabolism**, v.4, n.6, p.437–460, 2015.

MUNDINGER, T. O.; CUMMINGS, D. E.; TABORSKY, G. J. Direct stimulation of ghrelin secretion by sympathetic nerves. **Endocrinology**, v.147, n.6, p.2893–2901, 2006.

MUSOLINO, V.; PALUS, S.; TSCHIRNER, A.; DRESCHER, C.; GLIOZZI, M.; CARRESI, C.; VITALE, C.; MUSCOLI, C.; DOEHNER, W.; VON HAEHLING, S.; ANKER, S. D.; MOLLACE, V.; SPRINGER, J. Megestrol acetate improves cardiac function in a model of cancer cachexia-induced cardiomyopathy by autophagic modulation. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v.7, n.5, p.555–566, 2016.

NAING, A.; DALAL, S.; ABDELRAHIM, M.; WHELER, J.; HESS, K.; FU, S.; HONG, D. S.; JANKU, F.; FALCHOOK, G. S.; ILUSTRE, A.; OUYANG, F.; KURZROCK, R. Olanzapine for cachexia in patients with advanced cancer: an exploratory study of effects on weight and metabolic cytokines. **Support Care Cancer**, v.23, p.2649–2654, 2015.

NAKAMURA, K.; TONOUCHE, H.; SASAYAMA, A.; ASHIDA, K. A Ketogenic Formula Prevents Tumor Progression and Cancer Cachexia by Attenuating Systemic Inflammation in Colon 26 Tumor-Bearing Mice. **Nutrients**. v.10, n.2, 2018.

NARSALE, A. A.; CARSON, J. A. Role of interleukin-6 in cachexia: therapeutic implications. **Current Opinion in Supportive and Palliative Care**, v.8, p.321–7, 2014.

NARSALE, A. A.; ENOS, R. T.; PUPPA, M. J.; CHATTERJEE, S.; MURPHY, E. A.; FAYAD, R.; PENA, M. O.; DURSTINE, J. L.; CARSON, J. A. Liver inflammation and metabolic signaling in *ApcMin/+* mice: the role of cachexia progression. **Plos One**, v.10, n.3, 2015.

NÄSLUND, E.; BOGEFORS, J.; GRYBÄCK, H.; JACOBSSON, H.; HELLSTRÖM, P. M. Gastric emptying: comparison of scintigraphic, polyethylene glycol dilution, and paracetamol tracer assessment techniques. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v.35, n.4, p.375–9, 2000.

NEDERGAARD, J.; CANNON, B. The browning of white adipose tissue: some burning issues. **Cell Metabolism**, v.20, n.3, p.396–407, 2014.

NEUNLIST, M.; ROLLI-DERKINDEREN, M.; LATORRE, R.; VAN LANDEGHEM, L.; CORON, E.; DERKINDEREN, P.; DE GIORGIO, R. Enteric glial cells: recent developments and future directions. **Gastroenterology**, v.147, n.6, p.1230–7, 2014.

NIU, F.; ZHAO, S.; XU, C. Y.; SHA, H.; BI, G. B.; CHEN, L.; YE, L.; GONG, P., NIE, T. H. Potentiation of the antitumor activity of adriamycin against osteosarcoma by cannabinoid WIN-55,212-2. **Oncology Letters**, v.10, n.4, p.2415–2421, 2015.

NOMPLEGGI, D.; MYERS, L.; CASTELL, D. O.; DUBOIS, A. Effect of prostaglandin E2 analog on gastric emptying and secretion in rhesus monkeys. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.212, 1980.

NØHR, M. K.; THALE, Z. I.; BRODIN, B.; HANSEN, S. H.; HOLM, R.; NIELSEN, C. U. Intestinal absorption of the antiepileptic drug substance vigabatrin is altered by infant formula in vitro and in vivo. **Pharmacology Research & Perspectives**, v.2, n.2, 2014.

NORBERG, K. A.; SJOQVIST, F. New possibilities for adrenergic modulation of ganglionic transmission. **Pharmacological Reviews**, v.18, n.1, p.743–751, 1966.

NYLANDER, B.; MATTSSON, O. Effect of 16,16-dimethyl PGE₂ on gastric emptying and intestinal transit of a barium-food test meal in man. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v.10, n.3, p.289-292, 1975.

O'DONNELL, A. M.; COYLE, D.; PURI, P. Decreased expression of hyperpolarisation-activated cyclic nucleotide-gated channel 3 in Hirschsprung's disease. **World Journal of Gastroenterology**, v.21, n.18, p.5635–5640, 2015.

OH, C. M.; PARK, S.; KIM, H. Serotonin as a New Therapeutic Target for Diabetes Mellitus and Obesity. **Diabetes & Metabolism Journal**, v.40, p.89–98, 2016.

OH, J. H.; LEE, J. Y.; BAEG, M. K.; HAN, K.-H.; CHOI, M.-G.; PARK, J. M. Antineoplastic Effect of WIN 55,212-2, a Cannabinoid Agonist, in a Murine Xenograft Model of Gastric Cancer. **Chemotherapy**, v.59, p.200-206, 2013.

OHBUCHI, K.; NISHIUMI, S.; FUJITSUKA, N.; HATTORI, T.; YAMAMOTO, M.; INUI, A.; AZUMA, T.; YOSHIDA, M. Rikkunshito Ameliorates Cancer Cachexia Partly through Elevation of Glucuronate in Plasma. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine : eCAM**, v.2015, 2015.

OHLSSON, B. Gonadotropin-Releasing Hormone and Its Role in the Enteric Nervous System. **Frontiers in Endocrinology**, v.8, n.110, 2017.

OKOSHI, M. P.; CAPALBO, R. V.; ROMEIRO, F. G.; OKOSHI, K. Cardiac Cachexia: Perspectives for Prevention and Treatment. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.108, n.1, p.74–80, 2017.

OLIVEIRA, R. de C. M.; MONTEIRO, F. de S.; SILVA, J. L. V.; RIBEIRO, L. A. A.; SANTOS, R. F.; NASCIMENTO, R. J. B.; DUARTE, J. C.; AGRA, M. de F.; SILVA, T. M. S.; ALMEIDA, F. R. de C.; SILVA, B. A. Extratos metanólico e acetato de etila de *Solanum megalonyx* Sendtn. (Solanaceae) apresentam atividade espasmolítica em íleo isolado de cobaia: um estudo comparativo. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n.2, 2006.

ONESTI, J. K.; GUTTRIDGE, D. C. Inflammation based regulation of cancer cachexia. **BioMed Research International**, v.2014, 2014.

ORIO, L.; CRESPO, I.; LÓPEZ-MORENO, J. A.; REYES-CABELLO, C.; RODRÍGUEZ DE FONSECA, F.; GÓMEZ DE HERAS, R. Additive effects of cannabinoid CB1 receptors blockade and cholecystokinin on feeding inhibition. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.98, n.2, p.220–226, 2011.

OSEI-HYIAMAN, D. Endocannabinoid system in cancer cachexia. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, v.10, n.4, p.443-448, 2007.

OWEN, K. P.; SUTTER, M. E.; ALBERTSON, T. E. Marijuana: respiratory tract effects. **Clinical Reviews in Allergy & Immunology**, v.46, n.1, p.65–81, 2014.

PALHETA JR., R. C.; ROLA, F. H.; LIRA, G. H.; GOMES, D. A.; CARVALHO, F. M.; ELIAS, L. L.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; OLIVEIRA, R. B.; SANTOS, A. A. Atrial stretch increases the gastric tonus of anesthetized rats. **Life Sciences**, v.86, p.441–7, 2010.

PALUS, S.; VON HAEHLING, S.; FLACH, V. C.; TSCHIRNER, A.; DOEHNER, W.; ANKER, S. D.; SPRINGER, J. Simvastatin reduces wasting and improves cardiac function as well as outcome in experimental cancer cachexia. **International Journal of Cardiology**, v.168, n.4, p.3412–3418, 2013.

PATEL, H. J.; PATEL, B. M. TNF-alpha and cancer cachexia: molecular insights and clinical implications. **Life Sciences**, v.170, p.56–63, 2017.

PEDERSEN, J. E.; BERGQVIST, C. A.; LARHAMMAR, D. Evolution of vertebrate nicotinic acetylcholine receptors. **BMC Evolutionary Biology**, v.19, n.1, v.38, 2019.

PENNA, F.; COSTAMAGNA, D.; PIN, F.; CAMPERI, A.; FANZANI, A.; CHIARPOTTO, E. M.; CAVALLINI, G.; BONELLI, G.; BACCINO, F. M.; COSTELLI, P. Autophagic degradation contributes to muscle wasting in cancer cachexia. **American Journal of Pathology**, v.182, n.4, p.1367–78, 2013.

PENSTON, J. G.; WORMSLEY, K. G. The Effects of Prostaglandins on Gastric Emptying. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v.24, sup164, p.127–132, 1989.

PETER, J.; LAHR, J.; MINKOVA, L.; LAUER, E.; GROTHE, M. J.; TEIPEL, S.; KÖSTERING, L.; KALLER, C. P.; HEIMBACH, B.; HÜLL, M.; NORMANN, C.; NISSEN, C.; REIS, J.; KLÖPPEL, S. Contribution of the Cholinergic System to Verbal Memory Performance in Mild Cognitive Impairment. **Journal of Alzheimer's Disease**, v.53, n.3, p.991–1001, 2016.

PETRUZZELLI, M.; SCHWEIGER, M.; SCHREIBER, R.; CAMPOS-OLIVAS, R.; TSOLI, M.; ALLEN, J.; SWARBRICK, M.; ROSE-JOHN, S.; RINCON, M.; ROBERTSON, G.; ZECHNER, R.; WAGNER, E. F. A switch from white to brown fat increases energy expenditure in cancer-associated cachexia. **Cell Metabolism**, v.20, n.3, p.433–447, 2014.

PIN, F.; MINERO, V. G.; PENNA, F.; MUSCARITOLI, M.; DE TULLIO, R.; BACCINO, F. M.; COSTELLI, P. Interference with Ca^{2+} -Dependent Proteolysis Does Not Alter the Course of Muscle Wasting in Experimental Cancer Cachexia. **Frontiers in Physiology**, v.8, n.213, 2017.

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

PÖTGENS, S. A.; BROSEL, H.; SBOARINA, M.; CATRY, E.; CANI, P. D.; NEYRINCK, A. M.; DELZENNE, N. M.; BINDELS, L. B. *Klebsiella oxytoca* expands in cancer cachexia and acts as a gut pathobiont contributing to intestinal dysfunction. **Scientific Reports**, v.8, n.1, 2018.

PRENDERGAST, B. J.; ONISHI, K. G.; ZUCKER, I. Female mice liberated for inclusion in neuroscience and biomedical research. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v.40, p.1–5, 2014.

PRESCOTT, L. F. Kinetics and metabolism of paracetamol and phenacetin. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v.10, suppl 2, p.291S–298S, 1980.

QAMRI, Z.; PREET, A.; NASSER, M. W.; BASS, C. E.; LEONE, G.; BARSKY, S. H.; GANJU, R. K. Synthetic cannabinoid receptor agonists inhibit tumor growth and metastasis of breast cancer. **Molecular Cancer Therapeutics**, v.8, n.11, p.3117-29, 2009.

QUANJUN, Y.; GENJIN, Y.; LILI, W.; BIN, L.; JIN, L.; QI, Y.; YAN, L.; YONGLONG, H.; CHENG, G.; JUNPING, Z. Serum metabolic profiles reveal the effect of formoterol on cachexia in tumor-bearing mice. **Molecular BioSystems**, v.9, p.3015–3025, 2013.

RADZISZEWSKA, E.; BOJANOWSKA, E. Effects of glucagon-like peptide-1 receptor stimulation and blockade on food consumption and body weight in rats treated with a cannabinoid CB1 receptor agonist WIN 55,212-2. **Medical Science Monitor Basic Research**, v.19, p.6-11, 2013.

RANPURIA, R.; HALL, M.; CHAN, C. T.; UNRUH, M. Heart Rate Variability (HRV) in kidney failure: measurement and consequences of reduced HRV. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v.23, p.444–449, 2008.

RENFRO, L. A.; LOUPAKIS, F.; ADAMS, R. A.; SEYMOUR, M. T.; HEINEMANN, V.; SCHMOLL, H. J.; DOUILLARD, J. Y.; HURWITZ, H.; FUCHS, C. S.; DIAZ-RUBIO, E.; PORSCHE, R.; TOURNIGAND, C.; CHIBAUDEL, B.; FALCONE, A.; TEBBUTT, N. C.; PUNT, C. J.; HECHT, J. R.; BOKEMEYER, C.; VAN CUTSEM, E.; GOLDBERG, R. M.; SALTZ, L. B.; DE GRAMONT, A.; SARGENT, D. J.; LENZ, H. J. Body Mass Index Is Prognostic in Metastatic Colorectal Cancer: Pooled Analysis of Patients From First-Line Clinical Trials in the ARCAD Database. **Journal of Clinical Oncology**, v.34, n.2, p.144–150, 2016.

REUTER, S. E.; MARTIN, J. H. Pharmacokinetics of cannabis in cancer cachexia-anorexia syndrome. **Clinical Pharmacokinetics**, v.55, p.807–812, 2016.

RIAZI-FARZAD, B.; NICHOLLS, P. J.; SEWELL, R. D. Sensitivity differences to 5-HT and carbachol in subsections of the isolated rat stomach fundus strip: an improved preparation. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v.35, p.217-221, 1996.

ROBERTO, D.; KLOTZ, L. H.; VENKATESWARAN, V. Cannabinoid WIN 55,212-2 induces cell cycle arrest and apoptosis, and inhibits proliferation, migration, invasion, and tumor growth in prostate cancer in a cannabinoid-receptor 2 dependent manner. **The Prostate**, v.79, n.2, p.151-159, 2018.

ROBERTS, B. M.; AHN, B.; SMUDER, A. J.; AL-RAJHI, M.; GILL, L. C.; BEHARRY, A. W.; POWERS, S. K.; FULLER, D. D.; FERREIRA, L. F.; JUDGE, A. R. Diaphragm and ventilatory dysfunction during cancer cachexia. **FASEB Journal**, v.27, n.7, p.2600–2610, 2013.

ROY-CARSON, S.; NATUKUNDA, K.; CHOU, H.; PAL, N.; FARRIS, C.; SCHNEIDER, S. Q.; KUHLMAN, J. A. Defining the transcriptomic landscape of the developing enteric nervous system and its cellular environment. **BMC Genomics**, v.18, n.290, 2017.

ROY, S.; TRINCHIERI, G. Microbiota: a key orchestrator of cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**, v.17, n.5, p.271–85, 2017.

RUUD, J.; BLOMQUIST, A. Identification of rat brainstem neuronal structures activated during cancer-induced anorexia. **Journal of Comparative Neurology**, v.504, n.3, p.275–86, 2007.

RYAN, A. M.; POWER, D. G.; DALY, L.; CUSHEN, S. J.; NI BHUACHALLA, E.; PRADO, C. M. Cancer-associated malnutrition, cachexia and sarcopenia: the skeleton in the hospital closet 40 years later. **Proceedings of the Nutrition Society**, v.75, n.2, p.199–211, 2016.

SAKATA, I.; YAMAZAKI, M.; INOUE, K.; HAYASHI, Y.; KANGAWA, K.; SAKAI, T. Growth hormone secretagogue receptor expression in the cells of the stomach-projected afferent nerve in the rat nodose ganglion. **Neuroscience Letters**, v.342, p.183–186, 2003.

SALAZAR-DEGRACIA, A.; BUSQUETS, S.; ARGILÉS, J. M.; LÓPEZ-SORIANO, F. J.; BARREIRO, E. Formoterol attenuates increased oxidative stress and myosin protein loss in respiratory and limb muscles of cancer cachectic rats. **PeerJ**, v.5, e4109, 2017.

SALDEN, B. N.; MONSERRAT, V.; TROOST, F. J.; BRUINS, M. J.; EDENS, L.; BARTHOLOMÉ, R.; HAENEN, G. R.; WINKENS, B.; KONING, F.; MASCLÉE, A. A. Randomised clinical study: *Aspergillus niger*-derived enzyme digests gluten in the stomach of healthy volunteers. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v.42, n.3, p.273–285, 2015.

SANDEK, A.; SWIDSINSKI, A.; SCHROEDL, W.; WATSON, A.; VALENTOVA, M.; HERRMANN, R.; SCHERBAKOV, N.; CRAMER, L.; RAUCHHAUS, M.; GROSSE-HERRENTHEY, A.; KRUEGER, M.; VON HAEHLING, S.; DOEHNER, W.; ANKER, S. D.; BAUDITZ, J. Intestinal blood flow in patients with chronic heart failure a link with bacterial growth, gastrointestinal symptoms, and cachexia. **Journal of the American College of Cardiology**, v.64, n.11, p.1092–1102, 2014.

SANGER, G. J.; BROAD, J.; CALLAGHAN, B.; FURNESS, J. B. Ghrelin and Motilin Control Systems in GI Physiology and Therapeutics. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v.239, p.379–416, 2017.

SANGER, G. J.; FURNESS, J. B. Ghrelin and motilin receptors as drug targets for gastrointestinal disorders. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v.13, p.38–48, 2016.

SCHAEFER, M.; OEING, C. U.; ROHM, M.; BAYSAL-TEMEL, E.; LEHMANN, L. H.; BAUER, R.; VOLZ, H. C.; BOUTROS, M.; SOHN, D.; STICHT, C.; GRETZ, N.; EICHELBAUM, K.; WERNER, T.; HIRT, M. N.; ESCHENHAGEN, T.; MÜLLER-DECKER, K.; STROBEL, O.; HACKERT, T.; KRIJGSVELD, J.; KATUS, H. A.; BERRIEL DIAZ, M.; BACKS, J.; HERZIG, S. Ataxin-10 is part of a cachexokine cocktail triggering

cardiac metabolic dysfunction in cancer cachexia. **Molecular Metabolism**, v.5, n.2, p.67-78, 2016.

SCHCOLNIK-CABRERA, A.; CHÁVEZ-BLANCO, A.; DOMÍNGUEZ-GÓMEZ, G.; DUEÑAS-GONZÁLEZ, A. Understanding tumor anabolism and patient catabolism in cancer-associated cachexia. **American Journal of Cancer Research**, v.7, n.5, p.1107–1135, 2017.

SCHELLEKENS, H.; DINAN, T. G.; CRYAN, J. F. Lean mean fat reducing "ghrelin" machine: hypothalamic ghrelin and ghrelin receptors as therapeutic targets in obesity. **Neuropharmacology**, v.58, p.2–16, 2010.

SCHIEBER, A. M.; LEE, Y. M.; CHANG, M. W.; LEBLANC, M.; COLLINS, B.; DOWNES, M.; EVANS, R. M.; AYRES, J. S. Disease tolerance mediated by microbiome *E. coli* involves inflammasome and IGF-1 signaling. **Science**, v.350, n.6260, p.558-63, 2015.

SCOTT, D.; REID, J.; HUDSON, P.; MARTIN, P.; PORTER, S. Health care professionals' experience, understanding and perception of need of advanced cancer patients with cachexia and their families: The benefits of a dedicated clinic. **BMC Palliative Care**, v.15, n.100, 2016.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**, v.25, p.192-205, 1968.

SENIN, L. L.; AL-MASSADI, O.; FOLGUEIRA, C.; CASTELAO, C.; PARDO, M.; BARJA-FERNANDEZ, S.; SEOANE, L. M. The gastric CB1 receptor modulates ghrelin production through the mTOR pathway to regulate food intake. **Plos One**, v.8, n.11, 2013.

SHERTZER, H. G.; SCHNEIDER, S. N.; KENDIG, E. L.; CLEGG, D. J.; D'ALESSIO, D. A.; GENTER, M. B. Acetaminophen normalizes glucose homeostasis in mouse models for diabetes. **Biochemical Pharmacology**, v.75, p.1402–1410, 2008.

SILVA, E. A.; NATALI, M. R. M.; PRADO, I. M. M. The number and profile of reactive NADH-d and NADPH-d neurons of myenteric plexus of six-month-old rats are different in the cecum portions. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.28, n.5, p.241-248, 2008.

SILVA, M. T. B. da; MARQUES, R.; BATISTA-LIMA, F.; SOARES, M.; DOS SANTOS, A. A.; MAGALHÃES, P.; DE ASSIS OLIVEIRA, F.; DE CASTRO ALMEIDA, F. α -Terpineol Induces Gastric Retention of Liquids by Inhibiting Vagal Parasympathetic Pathways in Rats. **Planta Medica**, v.82, n.15, p.1329–1334, 2016.

SOARES, A.; BERARDI, E. J.; FERREIRA, P. E.; BAZOTTE, R. B.; BUTTOW, N. C. Intestinal and neuronal myenteric adaptations in the small intestine induced by a high-fat diet in mice. **BMC Gastroenterology**, v.15, n.3, 2015.

SOLOMOU, S.; KORBONITS, M. The role of ghrelin in weight-regulation disorders: implications in clinical practice. **Hormones (Athens)**, v.13, n.4, p.458-75, 2014.

SOURI, E.; RAHIMI, A.; SHABANI RAVARI, N.; BARAZANDEH TEHRANI, M. Development of a rapid derivative spectrophotometric method for simultaneous determination

of acetaminophen, diphenhydramine and pseudoephedrine in tablets. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research : IJPR**, v.14, n.2, p.435-42, 2015.

SOUZA, D. G.; CASSALI, G. D.; POOLE, S.; TEIXEIRA, M. M. Effects of inhibition of PDE4 and TNF-alpha on local and remote injuries following ischaemia and reperfusion injury. **British Journal of Pharmacology**, v.134, n.5, p. 985-994, 2001.

SPRINGER, J.; TSCHIRNER, A.; HAGHIKIA, A.; VON HAEHLING, S.; LAL, H.; GRZESIAK, A.; KASCHINA, E.; PALUS, S.; PÖTSCH, M.; VON WEBSKY, K.; HOCHER, B.; LATOUCHE, C.; JAISSER, F.; MORAWIETZ, L.; COATS, A. J.; BEADLE, J.; ARGILES, J. M.; THUM, T.; FÖLDES, G.; DOEHNER, W.; HILFIKER-KLEINER, D.; FORCE, T.; ANKER, S. D. Prevention of liver cancer cachexia-induced cardiac wasting and heart failure. **European Heart Journal**, v.35, n.14, p.932–941, 2014.

SRINIVAS, N. R. Acetaminophen Absorption Kinetics in Altered Gastric Emptying: Establishing a Relevant Pharmacokinetic Surrogate Using Published Data. **Journal of Pain & Palliative Care Pharmacotherapy**, v.29, n.2, p.115–119, 2015.

STEINMAN, J.; DEBOER, M. D. Treatment of cachexia: melanocortin and ghrelin interventions. **Vitamins and Hormones**, v.92, p.197-242, 2013.

STEWART COATS, A. J.; HO, G. F.; PRABHASH, K, VON HAEHLING, S.; TILSON, J.; BROWN, R.; BEADLE, J.; ANKER, S. D. Espindolol for the treatment and prevention of cachexia in patients with stage III/IV non-small cell lung cancer or colorectal cancer: a randomized, double-blind, placebo-controlled, international multicentre phase II study (the ACT-ONE trial). **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v.7, n.3, p.355–365, 2016.

SUN, B.; LUO, H.; DENG, L.; ZHANG, S.; CHEN, Z. The study on mechanism of the modified Chinese herbal compound, jianpijiedu, on a mouse model of hepatic carcinoma cachexia. **Molecular Medicine Reports**, v.14, n.4, p.3113-21, 2016.

SUN, L.; QUAN, X. Q.; YU, S. An epidemiological survey of cachexia in advanced cancer patients and analysis on its diagnostic and treatment status. **Nutrition and Cancer**, v.67, p.1056–1062, 2015.

SUK, K.-T.; MEDERACKE, I.; GWAK, G.-Y.; CHO, S. W.; ADEYEMI, A.; FRIEDMAN, R.; SCHWABE, R. F. Opposite roles of cannabinoid receptors 1 and 2 in hepatocarcinogenesis. **Gut**, v.65, p.1721-1732, 2016.

SUZUKI, H.; ASAKAWA, A.; AMITANI, H.; NAKAMURA, N.; INUI, A. Cancer cachexia—pathophysiology and management. **Journal of Gastroenterology**, v.48, n.5, p.574–594, 2013.

SZE, S.; PELLICORI, P.; KAMZI, S.; ANTON, A.; CLARK, A. L. Effect of beta-adrenergic blockade on weight changes in patients with chronic heart failure. **International Journal of Cardiology**, v.264, p.104–112, 2018.

TAKAHASHI, T.; OWYANG, C. Vagal control of nitric oxide and vasoactive intestinal polypeptide release in the regulation of gastric relaxation in rat. **Journal of Physiology**, v.484, p.481-492, 1995.

TAN, C. R.; YAFFEE, P. M.; JAMIL, L. H.; LO, S. K.; NISSEN, N.; PANDOL, S. J.; TULI, R.; HENDIFAR, A. E. Pancreatic cancer cachexia: a review of mechanisms and therapeutics. **Frontiers in Physiology**, v.5, n.88, 2014.

TERAWAKI, K.; KASHIWASE, Y.; SAWADA, Y.; HASHIMOTO, H.; YOSHIMURA, M.; OHBUCHI, K.; SUDO, Y.; SUZUKI, M.; MIYANO, K.; SHIRAISHI, S.; HIGAMI, Y.; YANAGIHARA, K.; HATTORI, T.; KASE, Y.; UETA, Y.; UEZONO, Y. Development of ghrelin resistance in a cancer cachexia rat model using human gastric cancer-derived 85As2 cells and the palliative effects of the Kampo medicine rikkunshito on the model. **Plos One**, v.12, n.3, e0173113, 2017.

TESSITORE, L.; BONELLI, G.; BACCINO, F. M. Early development of protein metabolic perturbations in the liver and skeletal muscle of tumour-bearing rats. **Biochemical Journal**, v.24, n.1, p. 53-159, 1987.

TESSITORE, L.; COSTELLI, P.; BONETTI, G.; BACCINO, F. M. Cancer Cachexia, Malnutrition, and Tissue Protein Turnover in Experimental Animals. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.306, n.1, p.52–58, 1993.

THANTHAN, S.; MEKARU, C.; SEKI, N.; HIDAKA K.; UENO, A.; THIDARMYINT, H.; KUWAYAMA, H. Endogenous ghrelin released in response to endothelin stimulates growth hormone secretion in cattle. **Domestic Animal Endocrinology**, v.38, p.1–12, 2010.

TOLEDO, M.; BUSQUETS, S.; PENNA, F.; ZHOU, X.; MARMONTI, E.; BETANCOURT, A.; MASSA, D.; LOPEZ-SORIANO, F. J.; HAN, H. Q.; ARGILES, J. M. Complete reversal of muscle wasting in experimental cancer cachexia: additive effects of activin type II receptor inhibition and beta-2 agonist. **International Journal of Cancer**, v.138, n.8, p.2021-9, 2016.

TOMINAGA, K.; KIDO, T.; OCHI, M.; SADAKANE, C.; MASE, A.; OKAZAKI, H.; YAMAGAMI, H.; TANIGAWA, T.; WATANABE, T.; FUJIWARA, Y.; OSHITANI, N.; ARAKAWA, T. The Traditional Japanese Medicine Rikkunshito Promotes Gastric Emptying via the Antagonistic Action of the 5-HT₃Receptor Pathway in Rats. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p.1–8, 2011.

TOUYZ, R. M.; ALVES-LOPES, R.; RIOS, F. J.; CAMARGO, L. L.; ANAGNOSTOPOULOU, A.; ARNER, A.; MONTEZANO, A. C. Vascular smooth muscle contraction in hypertension. **Cardiovascular Research**, v.114, n.4, p.529–539, 2018.

TRAVAGLI, R. A.; ANSELMINI, L. Vagal neurocircuitry and its influence on gastric motility. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v.13, p.389-401, 2016.

TROMBINI, A. B.; FRANCO, C. C. S.; MIRANDA, R. A.; DE OLIVEIRA, J. C.; BARELLA, L. F.; PRATES, K. V.; DE SOUZA, A. A.; PAVANELLO, A.; MALTA, A.; ALMEIDA, D. L.; TÓFOLO, L. P.; RIGO, K. P.; RIBEIRO, T. A.; FABRICIO, G. S.; DE SANT'ANNA, J. R.; CASTRO-PRADO, M. A.; DE SOUZA, H. M.; DE MORAIS, H.; MATHIAS, P. C. Early Treatment With Metformin Induces Resistance Against Tumor Growth In Adult Rats. **Cancer Biology & Therapy**, v.16, n.6, p.958–964, 2015.

TSCHIRNER, A.; VON HAEHLING, S.; PALUS, S.; DOEHNER, W.; ANKER, S. D.; SPRINGER, J. Ursodeoxycholic acid treatment in a rat model of cancer cachexia. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v.3, n.1, p.31-6, 2011.

TSOLI, M.; ROBERTSON, G. Cancer cachexia: malignant inflammation, tumorkines, and metabolic mayhem. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v.24, n.4, p.174–183, 2013.

TSOLI, M.; SWARBRICK, M. M.; ROBERTSON, G. R. Lipolytic and thermogenic depletion of adipose tissue in cancer cachexia. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v.54, p.68-81, 2016.

TURGEMAN, I.; BAR-SELA, G. Cannabis use in palliative oncology: A review of the evidence for popular indications. **Israel Medical Association Journal**, v.19, p.85-8, 2017.

UCHIYAMA, M.; MIHARA, M. Determination of Malonaldehyde Precursor in Tissues by Thiobarbituric Acid Test. **Analytical Biochemistry**, v.86, p.271-278, 1978.

UENO, H.; NAKAZATO, M. Mechanistic relationship between the vagal afferent pathway, central nervous system and peripheral organs in appetite regulation. **Journal of Diabetes Investigation**, v.7, n.6, p.812-818, 2016.

URANGA, J. A.; VERA, G.; ABALO, R. Cannabinoid pharmacology and therapy in gut disorders. **Biochemical Pharmacology**, v.157, p.134-147, 2018.

VALENTOVA, M.; VON HAEHLING, S.; BAUDITZ, J.; DOEHNER, W.; EBNER, N.; BEKFANI, T.; ELSNER, S.; SLIZIUK, V.; SCHERBAKOV, N.; MURÍN, J.; ANKER, S. D.; SANDEK, A. Intestinal congestion and right ventricular dysfunction: a link with appetite loss, inflammation, and cachexia in chronic heart failure. **European Heart Journal**, v.37, n.21, p.1684–1691, 2016.

VAN CAN, J.; SLOTH, B.; JENSEN, C. B.; FLINT, A.; BLAAK, E. E.; SARIS, W. H. M. Effects of the once-daily GLP-1 analog liraglutide on gastric emptying, glycemic parameters, appetite and energy metabolism in obese, non-diabetic adults. **International Journal of Obesity**, v.38, n.6, 784–793, 2014.

VANCE, S.; ZEIDAN, E.; HENRICH, V. C.; SANDROS, M. G. Comparative Analysis of Human Growth Hormone in Serum Using SPRi, Nano-SPRi and ELISA Assays. **Journal of Visualized Experiments**, v.107, e53508, p.1-10, 2016.

VAZQUEZ-SANDOVAL, A.; GHAMANDE, S.; SURANI, S. Critically ill patients and gut motility: Are we addressing it? **World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics**, v.8, n.3, p.174–179, 2017.

VELDHUIS, J. D.; BOWERS, C. Y. Integrating GHS into the Ghrelin System. **International Journal of Peptides**. v.10, p.1-40, 2010.

VERA, G.; FICHNA, J.; ABALO, R. Cannabinoids and Effects on the Gastrointestinal Tract: A Focus on Motility. **Handbook of Cannabis and Related Pathologies**, p.947–957, 2017.

VERSCHUEREN, S.; JANSSEN, P.; VAN OUDENHOVE, L.; HULTIN, L.; TACK, J. Effect of pancreatic polypeptide on gastric accommodation and gastric emptying in conscious rats. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal Liver Physiology**, v.307, p.G122–G128, 2014.

VICENTINI, G. E.; FRACARO, L.; DE SOUZA, S. R. G.; MARTINS, H. A.; GUARNIER, F. A.; ZANONI, J. N. Experimental Cancer Cachexia Changes Neuron Numbers and Peptide Levels in the Intestine: Partial Protective Effects after Dietary Supplementation with L-Glutamine. **Plos One**, v.11, n.9, 2016.

VIGANO, A. A. L.; MORAIS, J. A.; CIUTTO, L.; ROSENTHALL, L.; DI TOMASSO, J.; KHAN, S.; OLDERS, H.; BOROD, M.; KILGOUR, R. D. Use of routinely available clinical, nutritional, and functional criteria to classify cachexia in advanced cancer patients. **Clinical Nutrition**, v.36, n.5, p.1378-1390, 2016.

VON HAEHLING, S.; ANKER, M. S.; ANKER, S. D. Prevalence and clinical impact of cachexia in chronic illness in Europe, USA, and Japan: facts and numbers update 2016. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v.7, n.5, p.507–509, 2016.

WALTER, G. C.; PHILLIPS, R. J.; MCADAMS, J. L.; POWLEY, T. L. Individual sympathetic postganglionic neurons coinnervate myenteric ganglia and smooth muscle layers in the gastrointestinal tract of the rat. **The Journal of Comparative Neurology**, v.524, n.13, p.2577-603, 2016.

WANG, Q.; LISZT, K. I.; DELOOSE, E.; CANOVAI, E.; THIJS, T.; FARRÉ, R.; CEULEMANS, L. J.; LANNOO, M.; TACK, J.; DEPOORTERE, I. Obesity alters adrenergic and chemosensory signaling pathways that regulate ghrelin secretion in the human gut. **The FASEB Journal**, 2019.

WANG, Y.; CHEN, F.; SHI, H.; JIANG, J.; LI, H.; QIN, B.; LI, Y. Extrinsic ghrelin in the paraventricular nucleus increases small intestinal motility in rats by activating central growth hormone secretagogue and enteric cholinergic receptors. **Peptides**, v.74, p.43–49, 2015.

WERNER, K.; KÜLLENBERG DE GAUDRY, D.; TAYLOR, L. A.; KECK, T.; UNGER, C.; HOPT, U. T.; MASSING, U. Dietary supplementation with n-3-fatty acids in patients with pancreatic cancer and cachexia: marine phospholipids versus fish oil - a randomized controlled double-blind trial. **Lipids in Health and Disease**, v.16, 2017.

WHYTE, D. A.; AL-HAMMADI, S.; BALHAJ, G.; BROWN, O. M.; PENEFSKY, H. S.; SOUID, A. K. Cannabinoids inhibit cellular respiration of human oral cancer cells. **Pharmacology**, v.85, n.6, p.328–335, 2010.

WILLIAMS, D. L.; GRILL, H. J.; CUMMINGS, D. E.; KAPLAN, J. M. Vagotomy dissociates short- and long-term controls of circulating ghrelin. **Endocrinology**, v.144, n.12, p.5184–5187, 2003.

WILSON, R. I. Endocannabinoid Signaling in the Brain. **Science**, v.296, n.5568, p.678–682, 2002.

WING, S. S. Deubiquitinating enzymes in skeletal muscle atrophy—an essential role for USP19. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.79, 2016.

WU, J. T.; KRAL, J. G. Ghrelin: integrative neuroendocrine peptide in health and disease. **Annals of Surgery**, v.239, n.4, 464-74, 2004.

WU, R.; DONG, W.; ZHOU, M.; ZHANG, F.; MARINI, C. P.; RAVIKUMAR, T. S.; WANG, P. Ghrelin attenuates sepsis-induced acute lung injury and mortality in rats. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v.176, n.8, p.805–13, 2007.

XU, L.; DEPOORTERE, I.; TOMASETTO, C.; ZANDECKI, M.; TANG, M.; TIMMERMANS, J. P.; PEETERS, T. L. Evidence for the presence of motilin, ghrelin, and the motilin and ghrelin receptor in neurons of the myenteric plexus. **Regulatory Peptides**, v.124, p.119–125, 2005.

YAKABI, K.; HARADA, Y.; TAKAYAMA, K.; RO, S.; OCHIAI, M.; IIZUKA, S.; HATTORI, T.; WANG, L.; TACHÉ, Y. Peripheral α 2- β 1 adrenergic interactions mediate the ghrelin response to Brain urocortin 1 in rats. **Psychoneuroendocrinology**, v.50, p.300-10, 2014.

YAKABI, K.; SADAKANE, C.; NOGUCHI, M.; OHNO, S.; RO, S.; CHINEN, K.; AOYAMA, T.; SAKURADA, T.; TAKABAYASHI, H.; HATTORI, T. Reduced Ghrelin Secretion in the Hypothalamus of Rats due to Cisplatin-Induced Anorexia. **Endocrinology**, v.151, n.8, p.3773–3782, 2010.

YASMIN-KARIM, S.; MOREAU, M.; MUELLER, R.; SINHA, N.; DABNEY, R.; HERMAN, A.; NGWA, W. Enhancing the Therapeutic Efficacy of Cancer Treatment With Cannabinoids. **Frontiers in Oncology**, v.8, n.114, 2018.

YOSHIDA T. Contributions of the ascites hepatoma to the concept of malignancy of cancer. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.63, p.852–881, 1956.

YOSHIDA T. On the genesis of Yoshida sarcoma. **Gan**, v.42, p.241-243, 1951.

ZBUCKI, R.L.; SAWICKI, B.; HRYNIEWICZ, A.; WINNICKA, M. M. Cannabinoids enhance gastric X/A-like cells activity. **Folia Histochemica et Cytobiologica**, v.46, p.219–224, 2008.

ZHAO, T. J.; SAKATA, I.; LI, R. L.; LIANG, G.; RICHARDSON, J. A.; BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L.; ZIGMAN, J. M. Ghrelin secretion stimulated by β 1-adrenergic receptors in cultured ghrelinoma cells and in fasted mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.107, p.15868–15873, 2010.



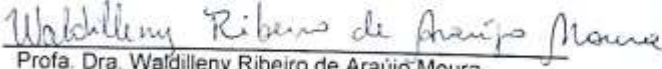
ZIMMERS, T. A.; FISHEL, M. L.; BONETTO, A. STAT3 in the Systemic Inflammation of Cancer Cachexia. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v.54, p.28–41, 2016.

ANEXO A – MAPA DOS TEMPOS UTILIZADO NO PROTOCOLO DE ESVAZIAMENTO GÁSTRICO

PESO DOS ANIMAIS (gramas)				
RATO 01	RATO 02	RATO 03	RATO 04	RATO 05
TEMPO	ATIVIDADE			
0 min	RATO 01 – GAVAGEM, ANESTESIA E COLETA 1			
10 min	RATO 02 – GAVAGEM, ANESTESIA E COLETA 1			
15 min	R1- COLETA 2			
20 min	RATO 03 – GAVAGEM, ANESTESIA E COLETA 1			
25 min	R2 – COLETA 2			
30 min	RATO 04 – GAVAGEM, ANESTESIA E COLETA 1 / R1 – COLETA 3			
35 min	R3 – COLETA 2			
40 min	RATO 05 – GAVAGEM, ANESTESIA E COLETA 1 / R2 – COLETA 3			
45 min	R4 – COLETA 2			
50 min	R3 – COLETA 3			
55 min	R5 – COLETA 2			
1:00 h	R4 – COLETA 3 / R1 – COLETA 4			
1:10 h	R5 – COLETA 3 / R2 – COLETA 4			
1:20 h	R3 – COLETA 4			
1:30 h	R4 – COLETA 4			
1:40 h	R5 – COLETA 4			
2:00 h	R1 – COLETA 5			
2:10 h	R2 – COLETA 5			
2:20 h	R3 – COLETA 5			
2:30 h	R4 – COLETA 5			
2:40 h	R5 – COLETA 5			
2:50 h	CENTRIFUGAÇÃO – C1, C2, C3, C4 e C5			
3:20 h	SEPARAR SORO – C1, C2, C3, C4 e C5			
3:50 h	SUPLEMENTAR ANESTESIA (MEIA DOSE) – R1, R2, R3, R4 e R5			
4:00 h	R1 – COLETA 6			
4:10 h	R2 – COLETA 6			
4:20 h	R3 – COLETA 6			
4:30 h	R4 – COLETA 6			
4:40 h	R5 – COLETA 6			
4:50 h	ADMINISTRAR SOLUÇÃO SALINA – R1, R2, R3, R4 e R5			
5:10 h	CENTRIFUGAÇÃO – C6			
5:30 h	SEPARAR SORO – C6			
5:40 h	CENTRIFUGAÇÃO DO SORO – C1, C2, C3, C4, C5 e C6			

Fonte: Própria.

ANEXO B – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ

	MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ PRÓ-REITORIA DE PESQUISA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil; CEP: 64049-550 Telefone (86) 3215-5734 _e-mail: ceeapi@ufpi.edu.br	
CERTIFICADO		
<p>Certificamos que a proposta intitulada "<i>Efeito da caquexia induzida por células de Yoshida AH-130 sobre a motilidade gástrica: investigação dos possíveis mecanismos</i>", registrada nº 432/18, sob a responsabilidade do Prof. Dr. MOISÉS TOLENTINO BENTO DA SILVA do Departamento de Educação Física/CCS/UFPI que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de Pesquisa Científica- encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi Aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPI) da Universidade Federal do Piauí, em Reunião na presente data 08/02/2018.</p>		
Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica	
Vigência da Autorização	Abril/ 2018 à Abril/ 2020	
Espécie/Linhagem/raça	Rato heterogênico/ wistar	
Nº de Animais	340	
Peso/ Idade	220-250g/ 8 semanas	
Sexo	Machos	
Origem	Biotério Central da UFPI.	
<p>Teresina, 08 de Fevereiro de 2018.</p> <p> Profa. Dra. Waldilenny Ribeiro de Araújo Moura Coordenador em Exercício da CEUA/UFPI</p>		