



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E CULTURA - MEC
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ - UFPI
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO - PRPG
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ALIMENTOS E NUTRIÇÃO - PPGAN

AMANDA FERRAZ BRAZ

**HETEROGENEIDADE DO TECIDO ADIPOSEO BRANCO EM MODELO
DE CAQUEXIA ASSOCIADA AO CÂNCER**

TERESINA - PI

2019

AMANDA FERRAZ BRAZ

**HETEROGENEIDADE DO TECIDO ADIPOSEO BRANCO EM MODELO DE
CAQUEXIA ASSOCIADA AO CÂNCER**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição da Universidade Federal do Piauí, como requisito para obtenção do título de Mestre em Alimentos e Nutrição.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Leonardo Torres-Leal

Co-orientador: Prof. Dr. Emídio Marques de Matos Neto

Área de Concentração: Alimentos e Nutrição

Linha de Pesquisa: Estudos Experimentais em Nutrição

TERESINA - PI

2019

AMANDA FERRAZ BRAZ

**HETEROGENEIDADE DO TECIDO ADIPOSEO BRANCO EM MODELO DE
CAQUEXIA ASSOCIADA AO CÂNCER**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição da Universidade Federal do Piauí, como requisito para obtenção do título de Mestre em Alimentos e Nutrição.

Aprovada em: 27/06/2019

Banca Examinadora:

Presidente - Orientador: Prof. Dr. Francisco Leonardo Torres-Leal – PPGAN – UFPI

1º Examinador: Prof^a. Dr^a. Salete Maria da Rocha Cipriano Brito – DBFa – UFPI

2º Examinador: Prof. Dr. Denny Esper Corrêa Cintra – FCA – UNICAMP

Examinador Suplente: Prof. Dr. Marcos Antônio Pereira dos Santos – DBFis – UFPI

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Fátima e Lourinaldo, por me permitirem realizar o sonho de fazer mestrado. Ao Guilherme, por todo amor e apoio incondicionais. Aos pacientes que sofrem de caquexia associada ao câncer, os quais são a maior fonte de motivação para a realização de pesquisas como esta e aos ratinhos, que doaram suas vidas para a concretização deste trabalho.

*“Não importa que os animais são incapazes ou não de pensar. O que importa é que são capazes de sofrer.”
(Autor desconhecido)*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado a vida e por ter permitido que eu chegasse até aqui. Não posso o ver, nem o tocar, mas o sinto fortemente todos os dias, guiando e iluminando meus caminhos. Obrigada por ter me concedido força e coragem para concretização desta etapa e por ter colocado pessoas maravilhosas ao meu lado. “Deus é bom o tempo todo e o tempo todo Deus é bom”.

Aos meus pais, Fátima e Lourinaldo, por todo esforço e dedicação para me proporcionar a melhor educação possível. Obrigada por me transmitirem tanto amor e zelo e por nunca medirem forças para que eu conseguisse realizar meus sonhos. Jamais poderei retribuir à altura, mas tento sempre lhes encher de orgulho.

Ao meu irmão, Anderson, por me incentivar a seguir em busca dos meus objetivos e por sempre acreditar que sou capaz.

À toda família Ferraz e à família Braz, por apoiar minhas escolhas. Cada um tem lugar especial no meu coração.

Ao Guilherme, por todo cuidado, carinho e atenção. Obrigada por todo incentivo e encorajamento durante o mestrado, por acreditar nos meus sonhos, vibrar com cada vitória, enxugar minhas lágrimas quando as coisas ficavam difíceis e por jamais me deixar desistir. Agradeço por ser paciente e compreensivo diante dos momentos de ausência. Sem o seu apoio eu não teria conseguido.

Ao meu orientador, professor Leonardo, acima de tudo, por me aceitar e acolher em seu grupo de alunos. Obrigada pelos ensinamentos e paciência, por não ter me deixado desistir, e pela dedicação, confiança, amizade e palavras de incentivo. Por ser um exemplo de professor, profissional e ser humano. O senhor é um verdadeiro mestre. Meus mais sinceros e carinhosos agradecimentos.

Ao meu co-orientador, professor Emídio, primeiramente, por me apresentar esse tema tão instigante e tão agradável de estudar. Serei eternamente grata por todo seu auxílio e contribuição no desenvolvimento desta pesquisa. Obrigada por, literalmente,

segurar nossa mão e nos ajudar nos cuidados com os ratinhos, pelas incríveis aulas sobre caquexia e pelos ensinamentos de justiça e amizade.

Ao professor Luciano, por sua leveza e paciência em me acompanhar e conduzir no estágio docente. O senhor é um professor e um ser humano grandioso. Obrigada por todos os ensinamentos científicos e didáticos e pelas dicas de aulas melhores. Agradeço por me inspirar e me encantar ainda mais pela docência.

Ao professor João, por sua alegria e disponibilidade em me ensinar cirurgia esterotáxica.

Ao professor Marcos, pelas valiosas contribuições durante a etapa de qualificação.

Ao professor Dr. Dennys e à professora Dr^a. Salete, por aceitarem o convite para participar da banca examinadora e por suas contribuições para melhorar este trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição (PPGAN), pelas oportunidades oferecidas e pelos conhecimentos compartilhados.

A todos os meus professores, do maternal ao mestrado, não só pelos ensinamentos de fórmulas e regras, mas pelas lições para vida. Vocês são minha verdadeira inspiração e deixaram marca eterna em meu caminho.

À Universidade Federal do Piauí (UFPI), por minha formação ao longo dos anos de Graduação e Pós-Graduação.

Aos funcionários do departamento de Nutrição e do departamento de Biofísica e Fisiologia por toda assistência, atenção e carinho diários.

A professora Dr^a. Marília Seelaender da Universidade de São Paulo (USP), e a todo o seu grupo de pesquisa, por gentilmente nos fornecer as células essenciais ao desenvolvimento deste estudo e por nos abrir as portas de seu laboratório para a realização das análises.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Aos meus queridos parceiros do grupo de pesquisa DOMEN, em especial, Cairo, Luís, Jardel e Bia, pela disponibilidade e colaboração. Vocês foram partes imprescindíveis desse trabalho. Essa conquista também é de vocês. Obrigada Luís por sua dedicação e abdicção para tornar possível a realização das análises.

Ao Eduardo por sua tranquilidade e parceria na construção da revisão sistemática, e à Lorena por compartilhar comigo as alegrias e as dificuldades da fase final do mestrado.

As minhas colegas de turma, Ana Cláudia, Ana Karine, Fabrícia, Márcia, Michelle, Rosana e Vanessa, por terem sido tão companheiras ao longo do mestrado. Cada êxito que tinha, a comemoração era melhor com vocês e cada dificuldade que enfrentava, o fardo era mais leve por tê-las ao meu lado. Jamais poderei agradecê-las de maneira suficiente e nunca as esquecerei. Vocês são as melhores!

Aos meus amigos e amigas da vida, por sempre estarem ao meu lado, como uma segunda família. Meus eternos agradecimentos e carinho a vocês. Em especial, à Luara, muito mais que amiga, irmã. Não tenho palavras para agradecer todos os conselhos, todo o apoio e momentos incríveis. Obrigada por torcer pela minha felicidade e por acreditar em mim. Agradeço por estar ao meu lado, vibrando com as minhas vitórias e chorando comigo nos momentos difíceis.

A todos, meus sinceros agradecimentos!

Amanda Ferraz Braz

“Seja forte e corajoso!
Não se apavore e nem desanime,
porque o Senhor, teu Deus,
estará contigo por onde você andar.”
(Josué 1:9)

RESUMO

BRAZ, A. F. **Efeitos da caquexia associada ao câncer sobre o balanço energético.** 2019. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição, Universidade Federal do Piauí. Teresina – PI.

A caquexia é definida como uma síndrome multifatorial resultante da perda contínua e involuntária de músculo, com ou sem depleção de gordura. Acomete 80% dos pacientes com câncer avançado, sendo a principal causa de morte em 30% desses indivíduos. A progressão da caquexia está associada a alterações metabólicas significativas, resultando em aumento do gasto energético, catabolismo e prejuízo na funcionalidade das células. A depleção de tecido adiposo branco (TAB) e sua concomitante mudança para tecido adiposo marrom (*browning*), representam uma má adaptação fisiológica, que agrava a perda de peso e a disfunção metabólica decorrentes da caquexia associada ao câncer. Apesar do crescente número de estudos focados na relação entre caquexia e desordens metabólicas, os mecanismos envolvidos permanecem complexos e pouco elucidados. Assim, investigou-se os efeitos deletérios da caquexia associada ao câncer sobre o balanço energético. A caquexia foi induzida pela inoculação intraperitoneal de células tumorais Yoshida AH-130 em ratos *Wistar*. Os animais do grupo controle receberam substância veículo. Massa corporal e consumo de ração foram avaliados diariamente durante sete dias de protocolo. A captura das imagens termográficas para determinação da temperatura do tecido adiposo marrom (TAM) ocorreu nos tempos 0, 4 e 7 dias. Tumor, TAB (epididimal, retroperitoneal e mesentérico), TAM e músculo gastrocnêmio foram coletados e pesados. Em seguida, procedeu-se a análise histológica das amostras de TAB epididimal e de TAM, bem como, avaliação da expressão de genes relacionados ao balanço energético no TAB epididimal. Foi observada progressão tumoral, redução da massa corporal, juntamente com o índice de caquexia, e depleção de gastrocnêmio nos animais do grupo tumor. A caquexia determinou redução do consumo de ração e da eficiência metabólica. No TAB epididimal houve incremento da massa e aumento do tamanho dos adipócitos, enquanto os depósitos retroperitoneal e mesentérico não foram alterados. Por outro lado, observamos redução do TAM. Os animais caquéticos também manifestaram aumento da expressão dos genes FAS e LPL no TAB epididimal e redução na temperatura do TAM ao final do protocolo. Logo, o modelo de caquexia associada ao câncer foi bem estabelecido e caracterizado. A caquexia promoveu expressiva redução no consumo alimentar e respostas heterogêneas entre os depósitos de tecido adiposo, evidenciado pelo tecido adiposo epididimal que apresentou incremento da lipogênese e pela depleção de tecido adiposo marrom.

Palavras-chave: Câncer; Caquexia; Tecido Adiposo; Balanço Energético.

ABSTRACT

BRAZ, A. F. **Effects of cancer cachexia on energetic balance.** 2019. Dissertation (Master) – Postgraduate Program in Food and Nutrition, Federal University of Piauí, Teresina - PI.

Cancer cachexia is defined as a multifactorial syndrome characterized by an ongoing loss of muscle mass, with or without loss of fat mass. In some cancers, the prevalence of cachexia in the advanced stages is nearly 80% and accounts as cause of death for up to 30% of cancer deaths. The progression of cachexia is associated with significant metabolic alteration, resulting in increased energy expenditure, catabolism and cell function impairment. Depletion of white adipose tissue (WAT) and its change to brown adipose tissue (browning), represents a maladaptive physiology response which aggravates the weight loss and the metabolic dysfunction as a consequence of cancer cachexia. Despite the increasing number of studies focused on the association between cachexia and metabolic disorders, the mechanisms involved remain complex and unknown. The aim of the present study has been to investigate the deleterious effects of cancer cachexia on the energy balance. Cancer cachexia was induced in male rats Wistar by intraperitoneal injection of Yoshida AH-130 ascites hepatoma cells. Control animals received vehicle. Body weight and food intake were assessed daily for seven days of protocol. Surface temperature of the interscapular region were recorded on days 0, 4 and 7. Three WAT depots: epididymal (eWAT); retroperitoneal (rWAT); mesenteric (mWAT), brown adipose tissue (BAT), gastrocnemius and tumor were collected and weighted. Samples from eWAT and BAT were stained with hematoxylin and eosin (H&E) for microscopic analysis. UCP1, PGC1 α , ADBR3, FAS and LPL mRNA expression were evaluated in the eWAT of controls and AH-130 hosts. Our results showed tumor progression, loss of body weight, decreased cachexia index and loss of gastrocnemius in tumor bearing animals. Cachexia determined reduction of food intake and metabolic efficiency. eWAT was increased and histological analysis revealed bigger adipocytes, while rWAT and mWAT were not altered. On the other hand, BAT displayed reduced weight compared with controls. The cachectic animals also showed increased expression of FAS and LPL mRNA in eWAT and reduction of BAT temperature at the end of the protocol. Therefore, the model of cancer cachexia was well established and characterized. Cachexia promoted expressive reduction in food intake and heterogeneous responses among adipose tissue depots, evidenced by eWAT that presented increased lipogenesis and by the depletion of brown adipose tissue.

Keywords: Cancer; Cachexia; Adipose Tissue; Energetic Balance.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Estágios da caquexia associada ao câncer..... | 22 |
| Figura 2. Principais órgãos e tecidos comumente afetados durante a caquexia associada ao câncer..... | 24 |
| Figura 3. Protocolo básico de implantação de tumor para indução de caquexia e interferência de algum tratamento..... | 25 |
| Figura 4. O metabolismo tumoral exerce influência e é influenciado por fatores em diversas escalas | 30 |
| Figura 5. Controle do consumo alimentar via eixo intestino-cérebro | 34 |
| Figura 6. Modelo de ativação do sistema central de melanocortina durante a caquexia | 35 |
| Figura 7. Depósitos de tecido adiposo | 37 |
| Figura 8. Componentes celulares do tecido adiposo branco | 38 |
| Figura 9. Representação das características morfológicas de adipócitos branco, bege e marrom | 41 |
| Figura 10. Localização anatômica dos adipócitos termogênicos em ratos e humanos | 42 |
| Figura 11. Mecanismos envolvidos no browning do tecido adiposo branco na caquexia associada ao câncer | 44 |
| Figura 12. Desenho experimental do estudo da caquexia..... | 49 |
| Figura 13. Região da pele sem pelos para captura das imagens termográficas..... | 51 |
| Figura 14. Esquema de coleta do tumor e dos tecidos..... | 53 |
| Figura 15. Caracterização da caquexia e avaliação de parâmetros relacionados | 59 |
| Figura 16. Efeito da caquexia associada ao câncer sobre o consumo de ração..... | 61 |
| Figura 17. Efeito da caquexia associada ao câncer sobre o coeficiente de eficiência metabólica (EM)..... | 62 |
| Figura 18. Massa e aspectos morfológicos do tecido adiposo branco (TAB) na caquexia associada ao câncer | 64 |
| Figura 19. Expressão gênica de fatores termogênicos e lipogênicos no tecido adiposo branco epididimal | 66 |
| Figura 20. Massa e aspectos morfológicos do tecido adiposo marrom (TAM) na caquexia associada ao câncer | 67 |
| Figura 21. Efeito da caquexia associada ao câncer sobre a temperatura do tecido adiposo marrom (TAM) | 69 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Resumo das diferenças observadas entre os modelos de caquexia associada ao câncer.. | 26 |
| Tabela 2. Descrição dos primers utilizados nas análises de PCR-RT. | 57 |

LISTA DE QUADROS

| | |
|---|----|
| Quadro 1. Cálculo do consumo de ração por animal..... | 49 |
| Quadro 2. Cálculo da variação da massa corporal..... | 50 |
| Quadro 3. Equação do índice de caquexia..... | 50 |
| Quadro 4. Cálculo da eficiência metabólica..... | 51 |
| Quadro 5. Determinação da massa relativa dos tecidos. | 52 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|---------------|--|
| ADRB3 | Receptor β 3-adrenérgico |
| AgRP | Peptídeo relacionado ao gene <i>agouti</i> |
| AGs | Ácidos graxos |
| ANOVA | Análise de variância |
| ARC | Núcleo arqueado |
| ATGL | Triacilglicerol lipase do tecido adiposo |
| ATP | Adenosina trifosfato |
| bp | Pares de bases |
| C26 | Adenocarcinoma de cólon 26 |
| CA | Califórnia |
| CAFs | Fibroblastos associados ao câncer |
| CART | Transcrito regulado pela cocaína e anfetamina |
| CCA | Centro de Ciências Agrárias |
| CCK | Colecistoquinina |
| cDNA | DNA complementar |
| CEUA | Comissão de Ética no Uso de Animais |
| COBEA | Colégio Brasileiro de Experimentação Animal |
| CONCEA | Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal |
| CR | Consumo de ração |
| Ct | Limiar de ciclagem |
| CN | Grupo controle |
| DIO | Iodotironina deiodinase |
| dNTP | Desoxirribonucleotídeo trifosfato |
| EM | Eficiência metabólica |
| EPI | Tecido adiposo branco epididimal |
| EPM | Erro-padrão da média |
| FAS | Ácido graxo sintase |
| FVE | Fração vascular estromal |
| g | Gramas |
| G | Força gravitacional |
| GLP1 | Peptídeo semelhante ao glucagon 1 |

| | |
|--------------------------------|---|
| GLUTs | Transportadores de glicose |
| H&E | Hematoxilina e eosina |
| HIF | Fatores de transcrição induzíveis por hipóxia |
| HPRT1 | Hipoxantina Fosforribosiltransferase 1 |
| HSL | Lipase hormônio sensível |
| IC | Índice de caquexia |
| ICB | Instituto de Ciências Biomédicas |
| IFN-γ | Interferon- γ |
| IGF-1 | Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 |
| IL-1 | Interleucina-1 |
| IL-6 | Interleucina-6 |
| IMC | Índice de massa corporal |
| INPM | Instituto Nacional de Massas e Medidas |
| LHA | Área hipotalâmica lateral |
| LLC | Carcinoma pulmonar de Lewis |
| LMF | Fator mobilizador de lipídios |
| LPL | Lipase lipoproteica |
| MAC16 | Adenocarcinoma de cólon 16 |
| MAtec | Massa absoluta do tecido |
| MATs | Macrófagos associados ao tumor |
| MC | Massa corporal |
| MCcont. | Massa corporal do grupo controle |
| MCf | Massa corporal final |
| MCG 101 | Sarcoma induzido por metilcolantreno 101 |
| MCi | Massa corporal inicial |
| MCP-1 | Proteína 1 quimiotática de monócito |
| MCR3 | Receptor 3 de melanocortina |
| MCR4 | Receptor 4 de melanocortina |
| MCT4 | Transportador de monocarboxilato 4 |
| MEC | Matriz extracelular |
| MES | Tecido adiposo branco mesentérico |
| mg | Miligrama |
| mg/Kg | Miligrama por quilograma |

| | |
|----------------|--|
| MGL | Lipase de monoacilglicerol |
| mL | Mililitro |
| mRNA | RNA mensageiro |
| Mφ | Macrófago |
| MRtec | Massa relativa do tecido |
| MT | Massa do tumor |
| ND | Não detectado |
| NF-kB | Fator nuclear kappa B |
| ng | Nanograma |
| nm | Nanômetro |
| nM | Nanomolar |
| NPY | Neuropeptídeo Y |
| NTS | Núcleo do trato solitário |
| PBS | Solução tampão fosfato salina |
| PCR | Proteína de fase aguda C reativa |
| PGC1α | Coativador gama de receptor ativado por proliferador de peroxissoma 1 alfa |
| PI | Pós-implante |
| PIF | Fator indutor de proteólise |
| POMC | Pró-opiomelanocortina |
| PPAR | Receptor ativado por proliferador de peroxissoma |
| PRDM 16 | Proteína contendo domínio PR 16 |
| PTHrP | Peptídeo relacionado ao hormônio da paratireoide |
| PVN | Núcleo paraventricular |
| PYY | Peptídeo tirosina-tirosina |
| qPCR-RT | Reação em cadeia de polimerase quantitativa em tempo real |
| RET | Tecido adiposo branco retroperitoneal |
| RPL32 | Proteína ribossômica L32 |
| SNC | Sistema nervoso central |
| STAT3 | Transdutor de sinal e ativador de transcrição |
| TA | Tecido adiposo |
| TAB | Tecido adiposo branco |
| TAM | Tecido adiposo marrom |
| Taq | <i>Thermus aquaticus</i> |

| | |
|--------------------------------|--|
| TGF-β | Fator de transformação do crescimento- β |
| TM | Grupo tumor |
| TNF-α | Fator de necrose tumoral- α |
| UA | Unidade arbitrária |
| UCP1 | Proteína desacopladora 1 |
| UFPI | Universidade Federal do Piauí |
| USP | Universidade de São Paulo |
| YAH-130 | Hepatoma ascítico Yoshida 130 |
| ZAG | Zinco- α 2-glicoproteína |
| α-MSH | Hormônio α estimulante de melanócitos |
| μg | Micrograma |
| μL | Microlitro |
| μm | Micrômetro |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 19 |
| 2. REVISÃO DA LITERATURA | 21 |
| 2.1 Definição, incidência e aspectos clínicos da caquexia associada ao câncer | 21 |
| 2.2 Modelos animais de caquexia associada ao câncer | 24 |
| 2.3 Câncer, microambiente tumoral e caquexia | 28 |
| 2.4 Controle do consumo alimentar, neuroinflamação e anorexia | 32 |
| 2.5 Organização, funções e regulação do tecido adiposo branco na caquexia | 36 |
| 2.6 Tecido adiposo marrom e <i>browning</i> na caquexia | 40 |
| 3 OBJETIVOS | 46 |
| 3.1 Geral | 46 |
| 3.2 Específicos | 46 |
| 4 METODOLOGIA | 47 |
| 4.1 Aspectos éticos | 47 |
| 4.2 Animais | 47 |
| 4.3 Inoculação de células tumorais | 47 |
| 4.3.1 Melhoramento da viabilidade das células tumorais | 47 |
| 4.3.2 Inoculação de células tumorais viáveis | 48 |
| 4.4 Desenho experimental | 48 |
| 4.5 Avaliação do consumo de ração | 49 |
| 4.6 Avaliação da massa corporal | 49 |
| 4.7 Cálculo do índice de caquexia | 50 |
| 4.8 Cálculo da eficiência metabólica | 50 |
| 4.9 Determinação da temperatura no tecido adiposo marrom | 51 |
| 4.10 Eutanásia dos animais | 51 |
| 4.11 Obtenção da massa tumoral e dos tecidos | 52 |
| 4.12 Análise histológica | 53 |
| 4.12.1 Obtenção e processamento dos tecidos | 53 |
| 4.12.2 Desparafinização e hidratação..... | 54 |

| | |
|--|-----------|
| 4.12.3 Coloração com Hematoxilina e Eosina (H&E) | 54 |
| 4.12.4 Análise das imagens | 54 |
| 4.13 Avaliação da expressão de genes | 54 |
| 4.13.1 Extração de RNA total..... | 54 |
| 4.13.2 Reação de transcrição reversa | 55 |
| 4.13.3 Seleção dos primers | 55 |
| 4.13.4 Reação em cadeia de polimerase em tempo real (PCR-RT)..... | 56 |
| 4.14 Análise estatística..... | 57 |
| 5 RESULTADOS | 58 |
| 5.1 Parâmetros de validação da caquexia..... | 58 |
| 5.2 Caquexia associada ao câncer reduz o consumo de ração..... | 60 |
| 5.3 Caquexia associada ao câncer reduz a eficiência metabólica | 62 |
| 5.4 Estudo do tecido adiposo branco na caquexia associada ao câncer | 63 |
| 5.5 Análise de expressão gênica no tecido adiposo branco epididimal | 65 |
| 5.6 Estudo do tecido adiposo marrom na caquexia associada ao câncer..... | 67 |
| 5.7 Avaliação da temperatura do tecido adiposo marrom na caquexia | 68 |
| 6. DISCUSSÃO | 70 |
| 7. CONCLUSÃO..... | 75 |
| REFERÊNCIAS | 76 |
| ANEXOS | 92 |
| ANEXO A – Aprovação do comitê de ética animal | 93 |
| ANEXO B – Artigo enviado para publicação..... | 94 |

1. INTRODUÇÃO

A caquexia é definida como uma síndrome multifatorial caracterizada pela perda contínua de massa muscular, com ou sem depleção de tecido adiposo, que não pode ser completamente revertida por meio de suporte nutricional convencional e que leva ao comprometimento funcional progressivo (ARGILÉS et al., 2019; VAZEILLE et al., 2017). É frequentemente subdiagnosticada, provavelmente devido à complexidade de suas manifestações clínicas, determinadas por uma combinação variável entre redução de massa corporal, anorexia, aumento do gasto energético e resistência à insulina (LIRA; ROSA NETO; SEELAENDER, 2014). Sintomas como astenia, letargia, febre, depressão e hiperalgesia também são geralmente observados em pacientes com caquexia (FEARON; ARENDS; BARACOS, 2013).

Esta síndrome, na maioria das vezes, acompanha doenças crônicas, incluindo câncer, doença renal, insuficiência cardíaca, doença pulmonar obstrutiva e artrite reumatoide (FARKAS et al., 2013). No câncer, a caquexia é uma manifestação frequente, cuja incidência varia entre os diferentes tipos de tumores, sendo superior a 80% no câncer pancreático e em torno de 60% no câncer de pulmão (LOUREIRO et al., 2014; AMITANI et al., 2013). Além disso, representa a causa de morte direta em aproximadamente 30% dos pacientes oncológicos (ZHENG et al, 2016). A caquexia associada ao câncer implica prognóstico ruim, piora da qualidade de vida, redução do tempo de sobrevivência e agravamento dos efeitos adversos durante a terapêutica (DAMRAUER et al., 2018; CHEVALIER; WINTER, 2014).

Os mecanismos moleculares relacionados à caquexia associada ao câncer não estão completamente compreendidos, mas sabe-se que alguns fatores como inflamação sistêmica e metabolismo anormal estão envolvidos (YAMASHITA et al, 2017). Parece que componentes pró-inflamatórios derivados do hospedeiro e das células tumorais desempenham papel central na patogenia da síndrome (LOUMAYE; THISSEN, 2017; DEBOER; MARKS, 2006). Dessa forma, a progressão da caquexia está associada a alterações metabólicas significativas, que provocam aumento do gasto energético, catabolismo, e interferem na funcionalidade normal das células (WANG, et al 2019; PATEL; PATEL, 2017; PETRUZZELI; WAGNER, 2016).

A fisiopatologia da caquexia envolve desequilíbrios no metabolismo das proteínas, lipídios e carboidratos, além de anorexia, resistência à insulina, aumento da ineficiência energética, estresse oxidativo e perda de massa muscular, o que

contribuiu para o aumento da morbidade relacionada ao câncer (ARGILÉS; BUSQUETS; LÓPEZ-SORIANO, 2019; PIN et al., 2019b; YOSHIMURA et al, 2017). O incremento da taxa de mobilização lipídica observado em pacientes caquéticos, pode ser explicado pela ativação da lipólise, decorrente da maior expressão das principais enzimas envolvidas nesse processo, bem como dos receptores β -adrenérgicos no tecido adiposo branco (TAB) (ARNER; LANGIN, 2014).

Como resultado, acontece o comprometimento metabólico dos estoques de gordura corporal, seguido de atrofia e remodelamento do tecido adiposo branco (BATISTA JÚNIOR; HENRIQUES, 2018). Da mesma forma, a depleção do tecido adiposo branco e sua concomitante mudança para tecido adiposo marrom (TAM), fenômeno conhecido como *browning*, representam uma má adaptação fisiológica, decorrentes do aumento da termogênese, o que agrava a perda de peso e a disfunção metabólica em pacientes com caquexia associada ao câncer (TSOLI; SWARBRICK; ROBERTSON, 2016).

A partir do contexto adverso atribuído à caquexia associada ao câncer, da importância da preservação da massa corporal para manutenção da homeostase sistêmica e de que os mecanismos envolvidos na relação entre caquexia e desordens metabólicas permanecem complexos e pouco elucidados, é de grande valia investigar os efeitos deletérios desta síndrome sobre o contexto do balanço energético.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Definição, incidência e aspectos clínicos da caquexia associada ao câncer

A palavra caquexia é derivada dos termos gregos “*kakos*” que significa má e “*hexis*” que significa condição, o que indica o mal estado geral de saúde das pessoas acometidas (GRANDA-CAMERON; LYNCH, 2018). A caquexia é uma manifestação frequente no câncer, porém não está restrita a essa patologia. Encontra-se, também, associada a outras doenças, principalmente, crônicas, tais como: doença renal, insuficiência cardíaca, doença pulmonar obstrutiva e artrite reumatoide (FARKAS et al., 2013).

A caquexia foi reconhecida há mais de 2.000 anos por Hipócrates apud Peterson; Mozer (2017) quando descreveu uma condição em que “A carne é consumida e se torna água, o abdômen se enche de água, os pés e as pernas incham, os ombros, clavícula, peito e as coxas derretem... A doença é fatal.” Mesmo tendo sido identificada há tantos anos, a caquexia ainda permanece subdiagnosticada e raramente tratada (HALLE et al, 2019; SEELAENDER et al., 2015).

Como resultado dos esforços da comunidade científica em determinar critérios claros de descrição da caquexia associada ao câncer, um grupo de pesquisadores propôs, no ano de 2011, em consenso formal e internacional, uma definição para caquexia, bem como os estágios de progressão da doença (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CUIDADOS PALIATIVOS, 2011). A partir daí, a caquexia associada ao câncer foi definida como uma “síndrome multifatorial resultante da perda contínua e involuntária de massa muscular, com ou sem depleção de gordura, que não pode ser totalmente revertida pela terapia nutricional convencional e que leva ao comprometimento funcional progressivo do organismo” (FEARON et al., 2011).

Neste mesmo consenso, foram determinados três estágios de relevância clínica, de acordo com a gravidade da síndrome: pré-caquexia, caquexia, e caquexia refratária (ZHOU et al., 2018) (**Figura 1**). Na pré-caquexia, o risco de progressão é variável e depende de alguns fatores relacionados ao tumor, a citar: tipo, estágio e carência de resposta ao tratamento anticâncer, bem como, a presença de inflamação sistêmica. Pacientes com considerável perda de peso são classificados no estágio intermediário e a caquexia refratária é resultado de um grau bastante avançado de câncer (FEARON et al., 2011).

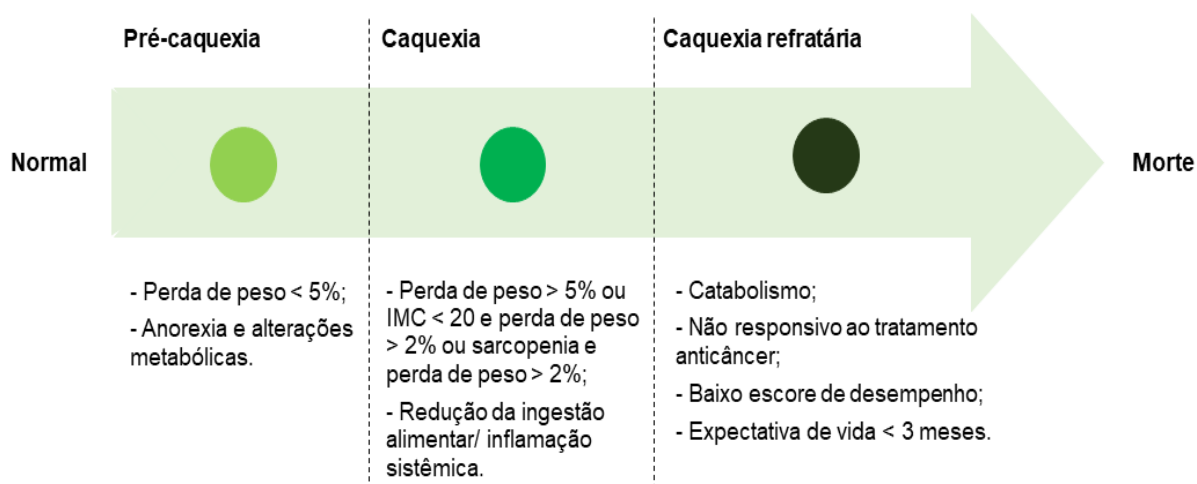


Figura 1. Estágios da caquexia associada ao câncer. Legenda: IMC = índice de massa corporal. Fonte: Adaptado de Fearon et al. (2011).

A caquexia caracteriza-se como uma síndrome multifatorial e multi-órgãos, uma vez que compromete diversas vias metabólicas, em muitos tecidos e sistemas do organismo (ARGILÉS et al., 2014). De modo que resulta da combinação sinérgica entre redução de massa corporal (decorrente da perda de massa magra e de adiposidade), anorexia secundária, aumento do gasto energético e resistência à insulina (LIRA; ROSA NETO; SEELAENDER, 2014). Além disso, sintomas como astenia, anemia, fadiga, fraqueza, alteração no apetite, má absorção intestinal e náuseas são frequentemente observados nos pacientes com caquexia (BINDELS et al., 2018; ARGILÉS et al., 2014).

Em torno de 50% dos pacientes com câncer são acometidos por caquexia, e esse número sobe para 80% naqueles com doença avançada (PIN et al., 2019a). O câncer pancreático representa a maior incidência (até 85%), enquanto os pacientes com câncer ginecológico (15%) e urológico (8%) são menos afetados (FREIRE et al., 2019; LIRA; ROSA NETO; SEELAENDER, 2014). Na Europa, em 2016, a prevalência de caquexia associada ao câncer foi estimada em um milhão de pessoas e cerca de 90% dos pacientes com câncer apresentavam risco de desenvolver caquexia (BINDELS et al., 2018). Além disso, representa a principal causa de morte em até 40% dos pacientes oncológicos, e varia entre 30-50% dos pacientes com câncer localizados no sistema digestivo (OZORIO; BARÃO; FORONES, 2017).

A caquexia exerce um importante impacto negativo na morbidade e mortalidade associadas ao câncer, bem como, afeta a qualidade de vida, o tempo de sobrevivência, e agrava os efeitos adversos durante a terapêutica (quimioterapia ou radioterapia) (DAMRAUER et al., 2018; ZHOU et al., 2018). A perda de peso é um importante indicador no câncer, cuja intensidade é inversamente proporcional ao prognóstico e está relacionada ao tempo de sobrevivência do paciente. Pacientes com perda de peso superior a 15% demonstram redução das funções fisiológicas, enquanto taxas próximas a 30% são quase sempre fatais, e poucos pacientes conseguem sobreviver até 50% de perda de peso (ALVES, 2016).

A fisiopatologia da caquexia é complexa, mas parece envolver uma série coordenada de mecanismos neurológicos, metabólicos, imunológicos e endocrinológicos (SEELAENDER et al., 2012; KRASNOW; MARKS, 2010). Profundas alterações no metabolismo de carboidratos, proteínas e gorduras, bem como, de hormônios e neuropeptídeos estão relacionadas à progressão da caquexia associada ao câncer (MATTOX, 2017; PATEL; PATEL, 2017). Como essas mudanças metabólicas iniciam, no sentido de induzir a caquexia, não está claro, porém, algumas hipóteses são propostas (WANG et al., 2018).

Por exemplo, a resposta inflamatória sistêmica de alto grau, comum em pacientes com câncer, é considerada um importante mediador - embora não seja o único - das alterações metabólicas presentes na progressão da caquexia (PATEL; PATEL, 2017; PORPORATO, 2016). O processo inflamatório resulta da liberação de citocinas pró-inflamatórias das células tumorais e das células do sistema imune (ARGILÉS; BUSQUETS; LÓPEZ-SORIANO, 2019). Estas citocinas, tais como, fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) e interferon- γ (IFN- γ), promovem a ativação de fatores de transcrição que estão associados à perda de massa corporal, anorexia e alterações na função de diversos órgãos e tecidos, a citar: intestino, músculo esquelético, tecido adiposo, cérebro, pâncreas e fígado, além do próprio tumor (MATTOX, 2017) (**Figura 2**).

Além das citocinas inflamatórias, outros fatores que são liberados pelas células tumorais contribuem para o quadro clínico desfavorável da caquexia (ARGILÉS; BUSQUETS; LÓPEZ-SORIANO, 2019). O fator indutor de proteólise (PIF) e o fator mobilizador de lipídios (LMF) (ou zinco- α 2-glicoproteína, ZAG), moléculas conhecidas como mediadores da caquexia, são capazes de estimular proteólise e lipólise, exercendo efeito catabólico direto nos tecidos durante a caquexia associada

ao câncer (SILVA et al., 2017; PATEL; PATEL, 2017). Assim, uma complexa interação tumor-hospedeiro é estabelecida, contribuindo para a progressão da síndrome (MATOS-NETO et al., 2015).

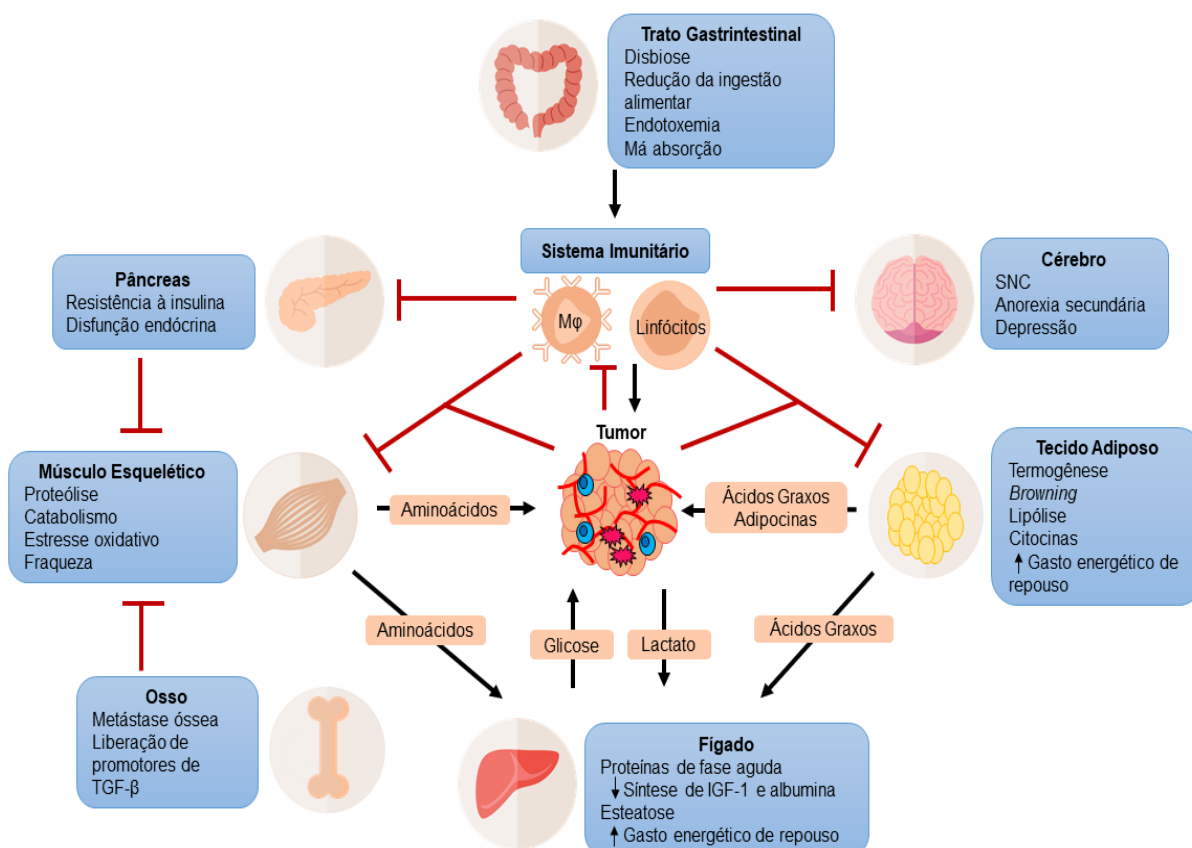


Figura 2. Principais órgãos e tecidos comumente afetados durante a caquexia associada ao câncer. Legenda: Mφ = macrófago; SNC = sistema nervoso central; TGF-β = fator de transformação do crescimento β; IGF-1 = fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1. Fonte: Adaptado de Porporato (2016).

2.2 Modelos animais de caquexia associada ao câncer

O uso de modelos experimentais, que se assemelham às manifestações das doenças em humanos, é útil por muitos motivos, incluindo a busca em contornar as limitações dos ensaios clínicos, a expansão do entendimento sobre os mecanismos fisiopatológicos subjacentes e as condições para investigar a eficácia de tratamentos prospectivos (PENNA; BUSQUETS; ARGILÉS, 2016). Neste contexto, a caquexia associada ao câncer tem sido bastante estudada em modelos animais, caracterizados pela inoculação de agentes carcinogênicos (**Figura 3**) ou, até mesmo, pelo uso de

camundongos geneticamente modificados para maior suscetibilidade ao desenvolvimento de câncer (BONETTO et al., 2016).

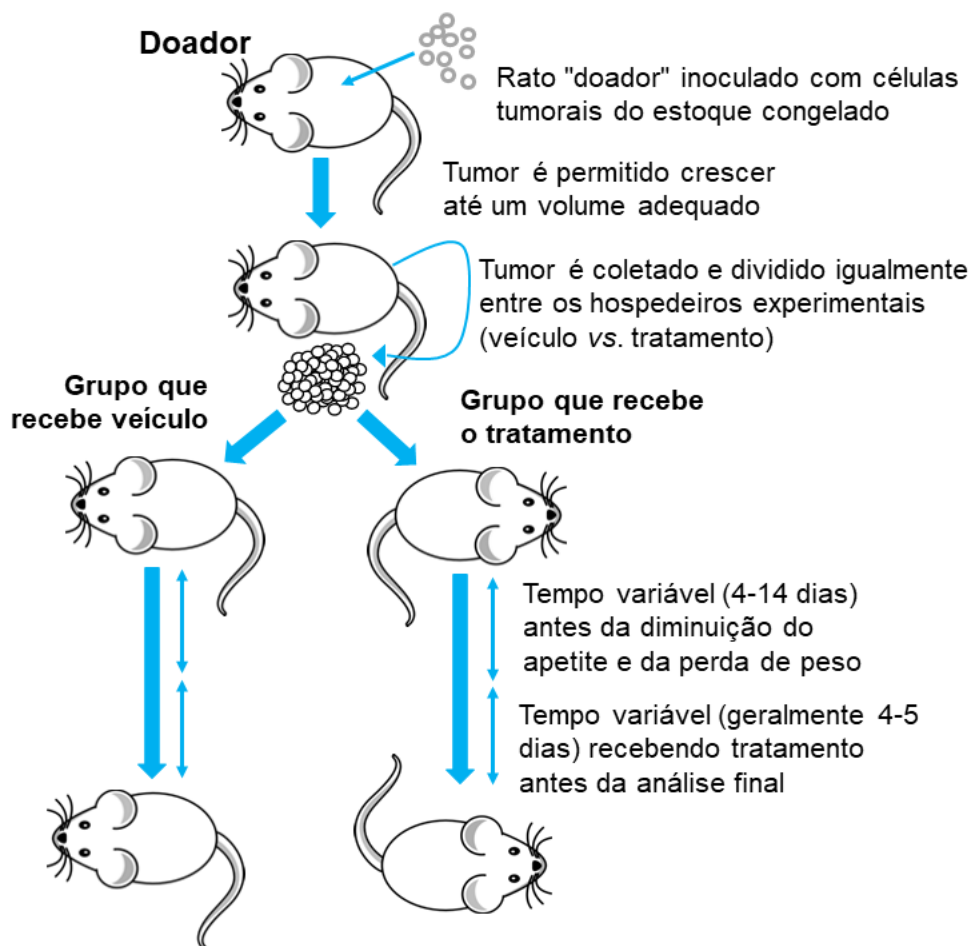


Figura 3. Protocolo básico de implantação de tumor para indução de caquexia e interferência de algum tratamento. Fonte: Adaptado de DeBoer (2009).

Um aspecto importante a ser considerado no estudo da caquexia é o dimorfismo sexual, de forma que observações clínicas têm demonstrado que os homens são mais afetados pela síndrome do que as mulheres, principalmente em relação ao peso corporal, massa e força muscular (MICHAELIS et al., 2017). Essas características também são observadas em investigações com modelo animal, tal qual demonstrado por Cospers; Leinwand (2011), em que camundongos machos com tumor sofreram maior perda de massa corporal, de músculo esquelético e cardíaco, bem como maior mortalidade do que as fêmeas. Logo, considerar o sexo do animal no desenvolvimento das pesquisas experimentais é um fator fundamental para o aumento do rigor e da reprodutibilidade dos estudos (CLAYTON, 2016).

Além disso, dada a heterogeneidade do câncer humano e as diferenças interespecies, os modelos experimentais não representam, em sua totalidade, a complexidade da caquexia (BALLARÒ; COSTELLI; PENNA, 2016). Portanto, outro fator essencial a ser considerado no desenvolvimento de trabalhos com animais é a escolha do modelo apropriado de acordo com as variáveis que se deseja investigar (ISHIDA et al., 2017). A esse respeito, numerosos modelos animais de caquexia foram estabelecidos na tentativa de esclarecer os mecanismos patogênicos desta síndrome (BALLARÒ; COSTELLI; PENNA, 2016).

Dentre os modelos comumente usados para estudar o desenvolvimento de caquexia, incluem-se: hepatoma ascítico Yoshida AH-130 (YAH-130) e carcinoma pulmonar de Lewis (LLC), os quais induzem caquexia e anorexia; adenocarcinoma MAC 16 (MAC16) e adenocarcinoma de cólon 26 (C26), que causam caquexia mas sem alteração no consumo alimentar, e carcinosarcoma Walker 256 (Walker 256) que apresenta elevada carga tumoral influenciando a caquexia e a anorexia (ISHIDA et al., 2017) (**Tabela 1**). Além disso, hepatoma de Morris 7777, sarcoma MCG 101 e sarcoma Yoshida, apesar de menos utilizados, também são modelos experimentais disponíveis para pesquisa de caquexia associada ao câncer (HOLECEK, 2012; BENNANI-BAITI; WALSH, 2011).

| | Carga tumoral (% de perda de peso*) | Anorexia | Caquexia | Sistema Imune | Inflamação |
|--|--|-----------------|-----------------|--------------------------|-------------------|
| Walker 256 | 50% | Sim | Sim | Intacto | Sim |
| MAC 16 | <1% 1 mês PI | Não | Sim | Intacto | Não |
| MCG 101 | 15% 5 dias PI | Sim | Sim | Intacto | Sim |
| YAH-130 | < 3% | Sim | Sim | Intacto | Sim |
| Hepatoma de Morris 7777 | -0,8% | Sim | Sim | Intacto | Sim |
| LLC | -6% | Sim | Sim | Intacto | Sim |

Tabela 1. Resumo das diferenças observadas entre os modelos de caquexia associada ao câncer. Legenda: PI = pós-implante; * porcentagem de perda de peso 2 semanas após a implantação, salvo indicação de outra forma. Fonte: Adaptado de Bennani-Baiti; Walsh (2011).

Para investigação da progressão e desenvolvimento da caquexia associada ao câncer, neste estudo, optou-se por utilizar o modelo de hepatoma ascítico Yoshida AH-130. Esta linhagem de células tumorais é capaz de promover um avanço rápido e agressivo do tumor, bem como evolução precoce de anorexia e caquexia, juntamente com resposta inflamatória sistêmica (ISHIDA et al., 2017; TSCHIRNER et al., 2012). A carga tumoral é significativamente inferior em comparação à maioria dos modelos usados, até 3% de perda de peso corporal, entretanto, a caquexia é persistente mesmo neste quadro de baixa carga do tumor (PENNA; BUSQUETS; ARGILÉS, 2016; HOLECEK, 2012).

O modelo de tumor YAH-130 foi originado a partir da conversão de formas sólidas de hepatoma, previamente estabelecido, em formas de tumor líquido gerador de ascite (YOSHIDA, 1956). O tumor se desenvolve a partir da formação de um fluido ascítico no peritônio, no qual as células crescem livres, organizadas em ilhas, e de forma linear até o sétimo dia após a inoculação, quando o crescimento desacelera e se estabiliza por volta do décimo segundo dia (PALUS et al., 2013). Sua ampla utilização nas pesquisas experimentais sobre caquexia, dentre outros fatores, pode ser atribuída ao crescimento bem caracterizado e à não formação de metástase (BALLARÒ; COSTELLI; PENNA, 2016).

Como supracitado, uma característica importante desencadeada pelas células tumorais Yoshida AH-130 é a maior resposta inflamatória, demonstrada pelo estudo de Vicente et al. (2004), que observaram aumento das concentrações plasmáticas do fator de necrose tumoral- α (TNF- α), após sete dias da inoculação intraperitoneal de células YAH-130 em ratas. Percebe-se, também, o surgimento de outras complicações decorrentes da proliferação das células tumorais, tais como o desenvolvimento de dismotilidade gastrointestinal, diminuição da sobrevivência (FUJITSUKA et al., 2011) e redução, abaixo dos valores normais, nas concentrações plasmáticas de vitamina D (CAMPERI et al., 2017).

Atrelado a isso, evidencia-se a perda de músculo esquelético resultante da caquexia associada a este modelo *in vivo* de câncer, que se caracteriza pela indução de alterações estruturais significativas, ativação de vias sinalizadoras de atrofia, aumento da atividade de proteassoma e pela ação de marcadores de autofagia (SALAZAR-DEGRACIA et al., 2018). Este quadro é equivalente ao observado para o músculo cardíaco, de forma que o tumor Yoshida AH-130 promove significativa atrofia

do coração, com piora progressiva da função cardíaca avaliada por ecocardiografia (ISHIDA et al., 2017).

Do mesmo modo, Ohbuchi et al. (2015) observaram rápido desenvolvimento de caquexia e anorexia, uma vez que, após sete dias de experimento, os animais apresentaram significativa redução no consumo de ração e na massa corporal. Nesse contexto, sabe-se que a caquexia não decorre apenas da redução da ingestão alimentar, mas a anorexia contribui significativamente para o déficit energético comum no câncer e, portanto, para a perda de peso progressiva (LAVIANO; GIRALDI; KOVERECH, 2016). Diante do exposto, nota-se que o hepatoma ascítico Yoshida AH-130 é um modelo bem caracterizado e estabelecido para o desenvolvimento de caquexia (ELKINA et al., 2013; MASTROCOLA et al., 2008), e parece ser apropriado para a investigação da patogênese da síndrome em humanos (HOLECEK, 2012).

2.3 Câncer, microambiente tumoral e caquexia

A massa tumoral não consiste apenas de células cancerígenas, também é composta por um complexo celular heterogêneo que inclui células endoteliais, mesenquimais, vasos sanguíneos e linfáticos, fibroblastos, macrófagos, linfócitos e adipócitos (BALKWILL; CAPASSO; HAGEMANN, 2012; UNGEFROREN et al., 2011). Estas células são recrutadas e corrompidas pelas células tumorais, que criam complexas interações entre si, formando o microambiente tumoral, do qual as células cancerígenas parecem se beneficiar (GUAITA-ESTERUELAS et al., 2018; GOUIRAND; GUILLAUMOND; VASSEUR, 2018).

Devido à complexidade do câncer e a participação crucial de seu microambiente na progressão e evolução tumoral, estes tem sido foco de diversas pesquisas, em busca de desenvolver novas ferramentas de tratamento e prognóstico da patologia (MUPPALLA et al., 2013). Além da comunicação existente entre as células do microambiente, o metabolismo tumoral está imerso no contexto das interações entre o tumor e o hospedeiro, ou seja, o “macro-ambiente” (PENET et al., 2011). Tais associações têm demonstrado contribuir para anormalidades metabólicas que favorecem o desenvolvimento da caquexia (MATSUYAMA et al., 2015). Embora, amplamente explorado nos últimos anos, o campo de estudo que envolve a relação das células do microambiente tumoral entre si, e com o hospedeiro, ainda é pouco conhecido (WANG et al., 2017).

O estroma é formado por uma porção celular e por tecido conjuntivo não celular, cuja função é fornecer sustentação aos órgãos, e como componente do microambiente tumoral, gera um importante efeito no câncer (VALKENBURG; GROOT; PIENTA, 2018). Fisiologicamente, o estroma representa uma barreira física contra a carcinogênese, entretanto, nas neoplasias, as células tumorais promovem alterações neste tecido, provocando sua ativação (JUNTTILA; SAUVAGE., 2013). A ativação inadequada do estroma potencializa e acelera a progressão do câncer, de forma que o microambiente se torna favorável para o crescimento tumoral ao invés de inibi-lo (CHEN et al., 2015).

Dentre os componentes do microambiente tumoral, os fibroblastos, há alguns anos, têm sido foco de investigações, uma vez que durante a progressão tumoral, essas células sofrem modificações e originam os fibroblastos associados ao câncer (CAFs) (TAO et al., 2017). Em condições naturais de reparo de lesões, os fibroblastos são ativados temporariamente para supressão do dano, entretanto, os CAFs permanecem ativados de maneira crônica, semelhante à fibrose tecidual (WANG et al., 2017). Esses fibroblastos alterados secretam quimiocinas e fatores de crescimento que promovem aumento de angiogênese patológica, deposição e remodelação da matriz extracelular, favorecendo a disseminação do tumor (ALLEN; JONES, 2011).

Outros pontos importantes a serem considerados no contexto do microambiente e do câncer são a hipóxia e a inflamação (GUAITA-ESTERUELAS et al., 2018). Semelhante aos demais tecidos, os tumores necessitam de suprimento vascular, porém a alteração do estroma ocasiona prejuízo no funcionamento dos vasos e, conseqüentemente, o suprimento de oxigênio e de nutrientes é insuficiente (MUPPALLA et al., 2013). Assim, se instaura um quadro de hipóxia, que é responsável por promover iniciação e progressão do tumor, bem como, resistência à terapia (CARNERO; LLEONART, 2016). A principal família de mediadores desta resposta são os fatores de transcrição induzíveis por hipóxia (HIF), pois estão envolvidos em aspectos importantes da biologia tumoral, como angiogênese, resistência à apoptose, divisão celular, aumento do metabolismo e inflamação (SIMON, 2016; ROHWER; CRAMER, 2011).

O estroma tumoral é caracterizado por um infiltrado inflamatório, formado por células do sistema imune, que reflete as condições inflamatórias observadas no câncer (MUPPALLA et al., 2013; HANAHAN; WEINBERG, 2011). As vias inflamatórias básicas envolvidas neste processo, incluem o transdutor de sinal e ativador de

transcrição (STAT3) e o fator nuclear kappa B (NF- κ B), que desencadeiam a proliferação celular, a regulação positiva das proteínas anti-apoptóticas e a modulação negativa da senescência celular (DONOHOE et al., 2017). Dentre as células inflamatórias, os macrófagos associados ao tumor (MATs) representam o principal componente do infiltrado inflamatório, e encontram-se associados à progressão tumoral (CARNERO; LLEONART, 2016; UNGEFROREN et al., 2011).

A proliferação celular crônica, que representa a essência do câncer, não envolve apenas o controle desregulado desse processo, mas também conta com a participação de ajustes no metabolismo energético para estimular o crescimento e a divisão celular (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Paralelamente, o metabolismo tumoral é influenciado pelo comportamento do hospedeiro, ou seja, o estilo de vida, os hábitos alimentares, o nível de atividade física, dentre outros fatores (DEWHIRST, 2015). Por outro lado, o tumor também pode interferir fortemente no metabolismo do hospedeiro, bem como na utilização dos substratos, o qual, comumente, se manifesta por meio da síndrome de caquexia (PENET; BHUJAWALLA, 2015) (**Figura 4**).

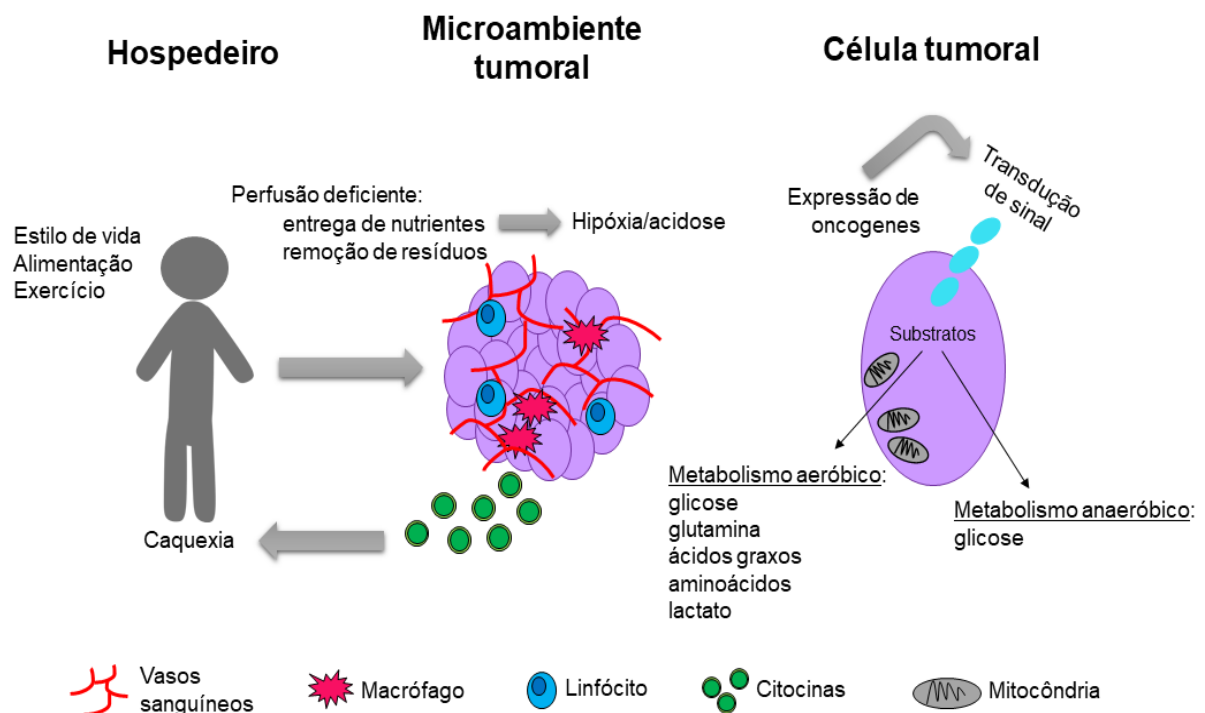


Figura 4. O metabolismo tumoral exerce influência e é influenciado por fatores em diversas escalas. Fonte: Adaptado de Dewhirst (2015).

Embora a produção de energia pela via da fosforilação oxidativa seja mais eficiente, a maioria das células tumorais gera ATP por meio da glicólise, mesmo em condições de disponibilidade de oxigênio (ZAAL; BERCKERS, 2018). Esse fenômeno é conhecido como “efeito Warburg” ou glicólise aeróbica, que resulta em uma maior taxa glicolítica e no aumento da formação de lactato secretado pelas células (CHEN et al., 2017; LIBERTI; LOCASALE, 2016). Para manter o fornecimento adequado de energia, as células tumorais superexpressam os transportadores de glicose (GLUTs) (WANG et al., 2018) e o transportador de monocarboxilato 4 (MCT4), que é responsável pela manutenção do pH intracelular por meio da regulação do efluxo de lactato (LEE et al., 2016).

Atrelado a isso, a secreção de lactato pelas células tumorais para o meio extracelular promove a redução do pH e cria um ambiente ácido que favorece o crescimento do tumor, promovendo migração e invasão celular (ZAAL; BERCKERS, 2018). Oncogenes e hipóxia também estão associados ao abastecimento glicolítico de energia, de forma que contribuem para a proliferação celular, a atenuação da apoptose e a supra regulação dos transportadores de glicose e das enzimas da via glicolítica (HANAHAN; WEINBERG, 2011). A partir daí, o lactato secretado é reconvertido à glicose no fígado, promovendo o aumento do gasto energético, o que contribui para o desenvolvimento da caquexia (WANG et al., 2018).

Em contrapartida, tem crescido o número de evidências que indicam limitações na teoria do “efeito Warburg” (FU et al., 2017). Os diversos tipos de tumores apresentam heterogeneidade metabólica, em que algumas células mantêm um fenótipo glicolítico, enquanto outras utilizam majoritariamente fosforilação oxidativa (WILDE et al., 2017). Isto é possível devido as complexas interações existentes entre as células tumorais e os CAFs do microambiente, que permitiu a determinação de um novo modelo de “dois compartimentos”, denominado “efeito Warburg reverso” (SOTGIA et al., 2012). Nesse contexto, os CAFs realizam glicólise aeróbica para produção de metabólitos ricos em energia que serão utilizados na fosforilação oxidativa pelas células tumorais, assim, tem-se a eficiente produção de ATP e, conseqüentemente, o aumento do potencial tumorigênico (YOSHIDA, 2015; MIGNECO et al., 2010; PAVLIDES et al., 2010).

Ao contrário do efeito Warburg, em alguns tipos de câncer, as células tumorais exibem elevadas taxas de fosforilação oxidativa (WILDE et al., 2017). Dessa forma, o efeito Warburg reverso consiste em um novo padrão metabólico, sua descoberta não

substitui o efeito Warburg tradicional, na verdade, amplia a heterogeneidade e a plasticidade do metabolismo do câncer, porém os mecanismos detalhados ainda não são claros (FU et al., 2017).

Adicionalmente à glicose, as células tumorais utilizam outros substratos para o fornecimento de energia (CARRACEDO; CANTLEY; PANDOLFI, 2013). Uma variedade de nutrientes não-glicêmicos, como aminoácidos, lactato e acetato, podem ser empregados como “combustíveis alternativos” pelas células cancerígenas (KEENAN; CHI, 2015). Os ácidos graxos (AGs) também constituem uma fonte de energia bastante relevante (CARRACEDO; CANTLEY; PANDOLFI, 2013). As células tumorais promovem o aumento da lipólise nos adipócitos, favorecendo a liberação de AGs que serão utilizados na produção de energia, o que melhora a motilidade celular e impulsiona a progressão tumoral (ACKERMAN; SIMON, 2014). Dessa forma, de acordo com as condições ambientais em que as células tumorais se encontram, seu metabolismo sofre alterações para se adaptar as necessidades das células (KEENAN; CHI, 2015; ESCOTÉ; FAJAS, 2014).

Em associação, todos esses fatores condicionam o desenvolvimento de caquexia associada ao câncer. Esta síndrome retarda a iniciação e a conclusão de terapias agressivas, além de interferir nas respostas ao tratamento (KIR; SPIEGELMAN, 2016). Infelizmente, hoje não existe terapia efetiva contra a caquexia associada ao câncer, mas acredita-se que o manejo desta condição necessite combinar tratamento anti-câncer e anti-caquexia (LAVIANO et al., 2005).

2.4 Controle do consumo alimentar, neuroinflamação e anorexia

O sistema nervoso central (SNC) abriga redes neurais complexas que integram e coordenam sinais para o controle da fome, saciedade e gasto de energia (ARRUDA et al., 2010). Em indivíduos saudáveis, os mecanismos de controle da homeostase energética funcionam adequadamente, estimulando ou interrompendo o consumo alimentar de acordo com o gasto energético (PRINZ; STENGEL, 2017). O hipotálamo desempenha papel fundamental na manutenção do equilíbrio energético ao compilar sinais neurais do tronco encefálico e dos centros corticais superiores (SUZUKI; JAYASENA; BLOOM, 2012).

No hipotálamo, o núcleo arqueado (ARC) é o local de integração energética responsável por coordenar o consumo alimentar. Nessa região estão localizadas duas

populações neuronais distintas que possuem atividades antagônicas (AMITANI et al., 2013). Um grupo é representado pelos neurônios anorexígenos que expressam pró-opiomelanocortina (POMC), hormônio α estimulante de melanócitos (α -MSH) e transcrito regulado pela cocaína e anfetamina (CART). O outro grupo compreende neurônios orexígenos que secretam neuropeptídeo Y (NPY) e peptídeo relacionado ao gene *agouti* (AgRP) (KRASNOW; MARKS, 2010).

Em condições fisiológicas, quando sinais anorexígenos atingem o ARC, ativam os neurônios que expressam POMC e CART, ao mesmo tempo que desativam a expressão de NPY e AgRP (PRINZ; STENGEL, 2017). A ativação de POMC estimula a síntese do α -MSH, que se liga aos receptores 3 e 4 de melanocortina (MCR3 e MCR4), suprimindo a ingestão alimentar (SUZUKI; JAYASENA; BLOOM, 2012). Por outro lado, sinais orexígenos estimulam neurônios liberadores de NPY e AgRP, enquanto inibem a secreção de POMC e CART no núcleo arqueado. NPY estimula a ingestão alimentar por ativação do receptor Y1 e o AgRP atua como antagonista de MCR3 e MCR4 (CAMILLERI, 2015)

Os sinais que desencadeiam respostas de sensação de fome ou saciedade são atribuídos aos peptídeos gastrointestinais que são secretados em consequência a ingestão de nutrientes (PRINZ; STENGEL, 2017). Carboidratos, lipídios e proteínas, quando em contato com o lúmen intestinal, ativam receptores presentes na membrana das células do epitélio do intestino e estimulam a liberação de peptídeos, tais quais peptídeo tirosina-tirosina (PYY), peptídeo semelhante ao glucagon 1 (GLP1) e grelina (RASOAMANANA et al., 2012) **(Figura 5)**.

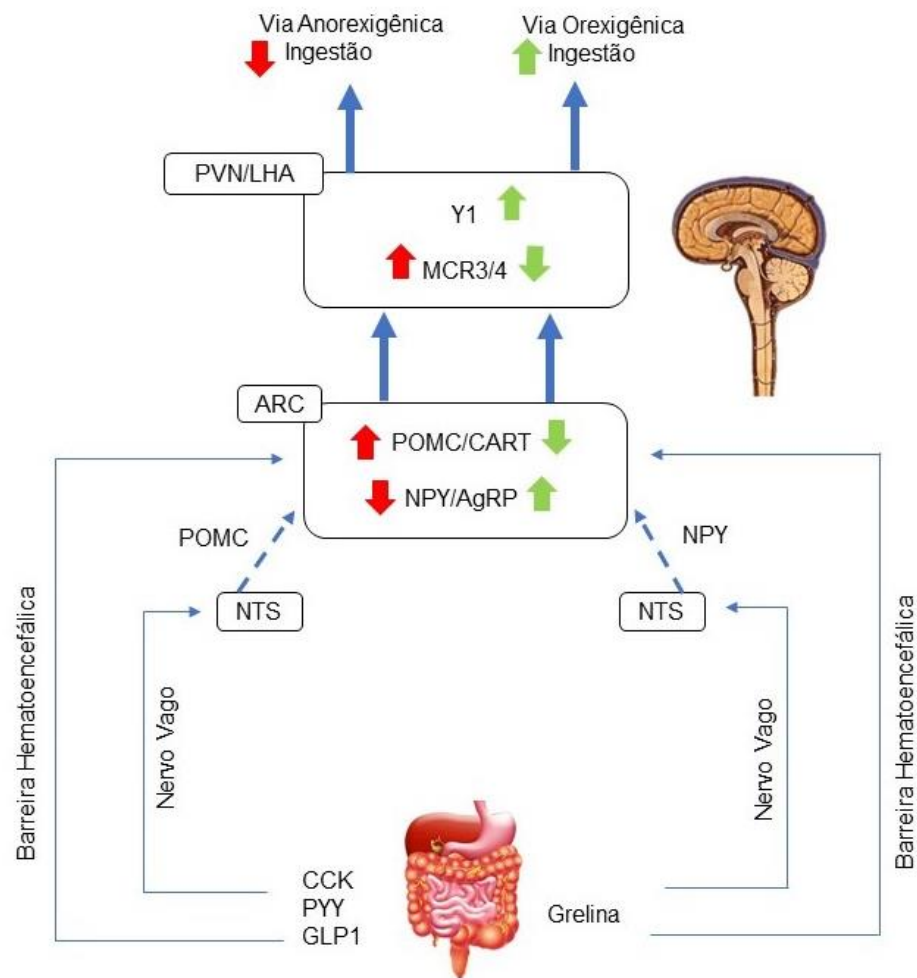


Figura 5. Controle do consumo alimentar via eixo intestino-cérebro. Legenda: PVN = núcleo paraventricular; LHA = área hipotalâmica lateral; Y1 = receptor 1 de NPY; MCR3/4 = receptores 3 e 4 de melanocortina; ARC = núcleo arqueado; POMC = pró-opiomelanocortina; CART = transcrito regulado pela cocaína e amfetamina; NPY = neuropeptídeo Y; AgRP = peptídeo relacionado ao gene agouti; NTS = núcleo do trato solitário; CCK: colecistoquinina; PYY = peptídeo tirosina-tirosina; GLP1 = peptídeo semelhante ao glucagon 1. Fonte: Adaptado de Prinz; Stengel (2017).

Contudo, em condições patológicas, com a presença de resposta inflamatória, como no câncer, ocorre uma perturbação nessa maquinaria neuronal, com marcado desbalanço na homeostase energética, o que contribui para o desenvolvimento de anorexia (GUILLEMONT-LEGRIS et al., 2016; DWARKASING et al., 2014; JEEJEEBHOY, 2012).

A anorexia secundária, diferente da anorexia nervosa, é um sintoma frequente que acompanha diversas doenças crônicas, como câncer, doença inflamatória

intestinal e insuficiência cardíaca (LUCIA et al., 2012; LAVIANO; MEGUID; ROSSI-FANELLI, 2003). A etiologia da anorexia secundária associada ao câncer é complexa e multifatorial, porém, acredita-se que é resultante da incapacidade do hipotálamo em responder adequadamente aos sinais orexígenos e anorexígenos. A resistência hipotalâmica a sinais envolvidos no controle do apetite, por sua vez, parece ser consequência do aumento de citocinas pró-inflamatórias (DWARKASING et al., 2014; MUSCARITOLI et al., 2010).

As citocinas pró-inflamatórias alteram a circuitaria cerebral, aumentando a liberação de neurotransmissores que influenciam os neurônios anorexígenos, por meio da estimulação do receptor MCR4 (LAVIANO et al., 2011). Por outro lado, os neurônios que produzem AgRP e NPY respondem às citocinas pela diminuição da sinalização orexigênica. Isso resulta em sinais que levam à caquexia (DEBOER; MARKS, 2006) (**Figura 6**).

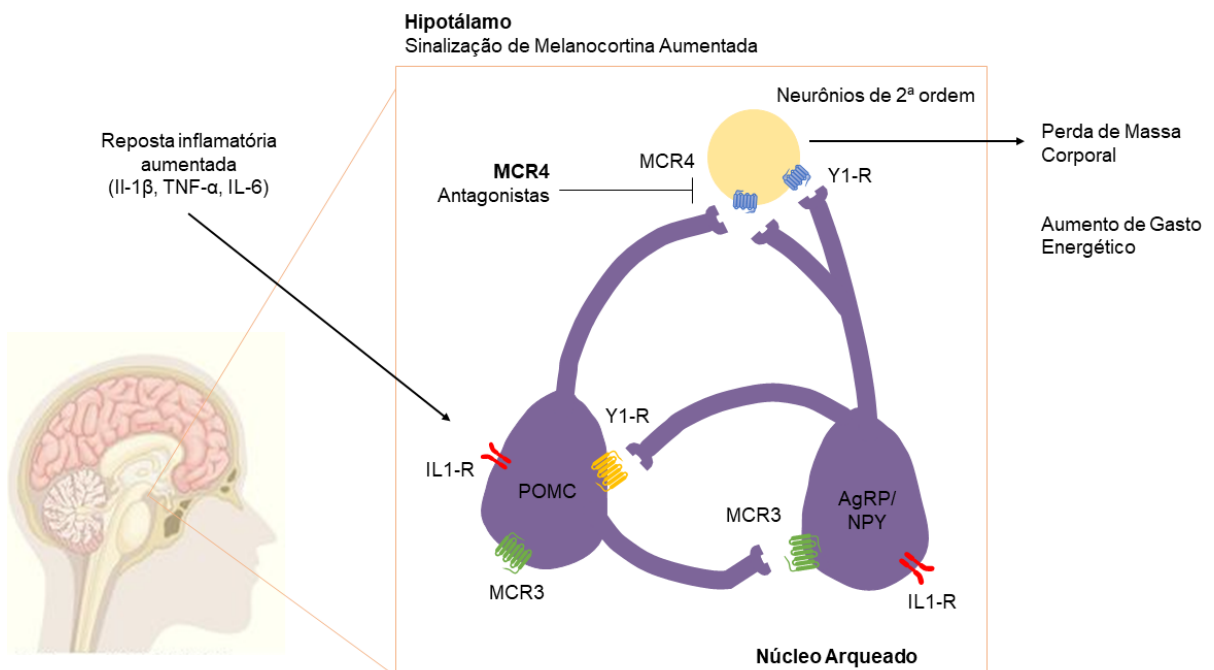


Figura 6. Modelo de ativação do sistema central de melanocortina durante a caquexia. Legenda: IL-1 = interleucina-1; TNF- α = fator de necrose tumoral α ; IL-6 = interleucina-6; MCR4 = receptor 4 de melanocortina; Y1-R = receptor 1 de NPY; IL1-R = receptor de interleucina-1; POMC = pró-opiomelanocortina; MCR3 = receptor 3 de melanocortina; AgRP = peptídeo relacionado ao gene agouti; NPY = neuropeptídeo Y. Fonte: Adaptado de Deboer; Marks (2006).

Os neurônios POMC e AgRP não sensíveis à citocinas pró-inflamatórias e ambos expressam receptor de interleucina-1 (IL-1) (SCARLETT et al., 2007). Molfino et al. (2015) e Krasnow; Marks (2010) observaram que infusões intracerebroventricular de IL-1 e de fator de necrose tumoral- α (TNF- α) promoveram ativação da sinalização do sistema melanocortina e aumento da liberação de α -MSH, o que leva ao catabolismo e anorexia. Por outro lado, a inibição dos receptores de IL-1 e o bloqueio de TNF- α hipotalâmicos, estimulou a ingestão alimentar.

Além disso, a atividade das citocinas pró-inflamatórias, a citar: TNF- α , IL-1, IL-6 e IFN- γ , prejudicam o metabolismo dos macronutrientes, promovendo a redução da síntese e o aumento da degradação de proteínas, a intensificação da lipólise, a supressão da enzima lipase lipoproteica (LPL), o aumento na produção de proteína de fase aguda C-reativa (PCR), o incremento da gliconeogênese e a resistência à insulina (PETERSON; MOZER, 2017; NICOLINI et al., 2013). Tais distúrbios metabólicos adicionados a anorexia contribuem para o desenvolvimento da caquexia (JEEJEEBHOY, 2012).

Os hormônios leptina e grelina também exercem seus efeitos sobre a resposta inflamatória crônica, bem como, sobre a homeostase energética. A leptina atua no hipotálamo inibindo o NPY e ativando o POMC, levando ao aumento da saciedade e diminuição da ingestão alimentar (AMITANI et al., 2013; DEBOER; MARKS, 2006). Mesmo em concentrações reduzidas na caquexia associada ao câncer a leptina é capaz de intensificar a atividade pró-inflamatória (STOFKOVA et al., 2010). Antagonicamente, a grelina estimula a expressão de AgRP e NPY no hipotálamo e encontra-se aumentada em pacientes com caquexia, entretanto não há a promoção do consumo alimentar, um fenômeno conhecido como resistência à grelina (GARCIA et al., 2005).

2.5 Organização, funções e regulação do tecido adiposo branco na caquexia

Classicamente, o tecido adiposo (TA) era descrito como um simples reservatório, exclusivamente dedicado ao armazenamento energético e isolamento térmico (SEELAENDER; BATISTA JÚNIOR, 2014). Porém, com a descoberta da leptina e da adiponectina - adipocinas secretadas pelo TA, o mesmo passou a ser estudado sob uma nova perspectiva e, atualmente, é considerado um órgão endócrino (SUCHACKI et al., 2017; TORRES-LEAL et al., 2010). Por meio da liberação das

adipocinas, o TA está envolvido em uma série de funções corporais, como inflamação, resposta imune, homeostase glicêmica, controle do apetite e composição corporal, tornando-o centro da regulação do metabolismo (FONSECA-ALANIZ et al., 2007).

Diferente dos outros órgãos, o tecido adiposo branco (TAB) encontra-se dividido em depósitos (viscerais e subcutâneos) distribuídos ao longo de todo o corpo (SCHOETTL; FISCHER; USSAR, 2018; VAITKUS; CELI, 2017). O tecido adiposo visceral é observado em torno dos órgãos internos, e o tecido adiposo subcutâneo está localizado sob a pele (SANCHEZ-GURMACHES; GUERTIN, 2014) (**Figura 7**). Apesar de ser composto principalmente de adipócitos (> 90%), o TAB apresenta uma população celular bastante heterogênea, formada por outros tipos celulares, tais como, pré-adipócitos, fibroblastos, células endoteliais, células musculares lisas e macrófagos, que, em conjunto, são referidas como células da fração vascular estromal (FVE) (SEELAENDER; BATISTA JÚNIOR, 2014) (**Figura 8**).

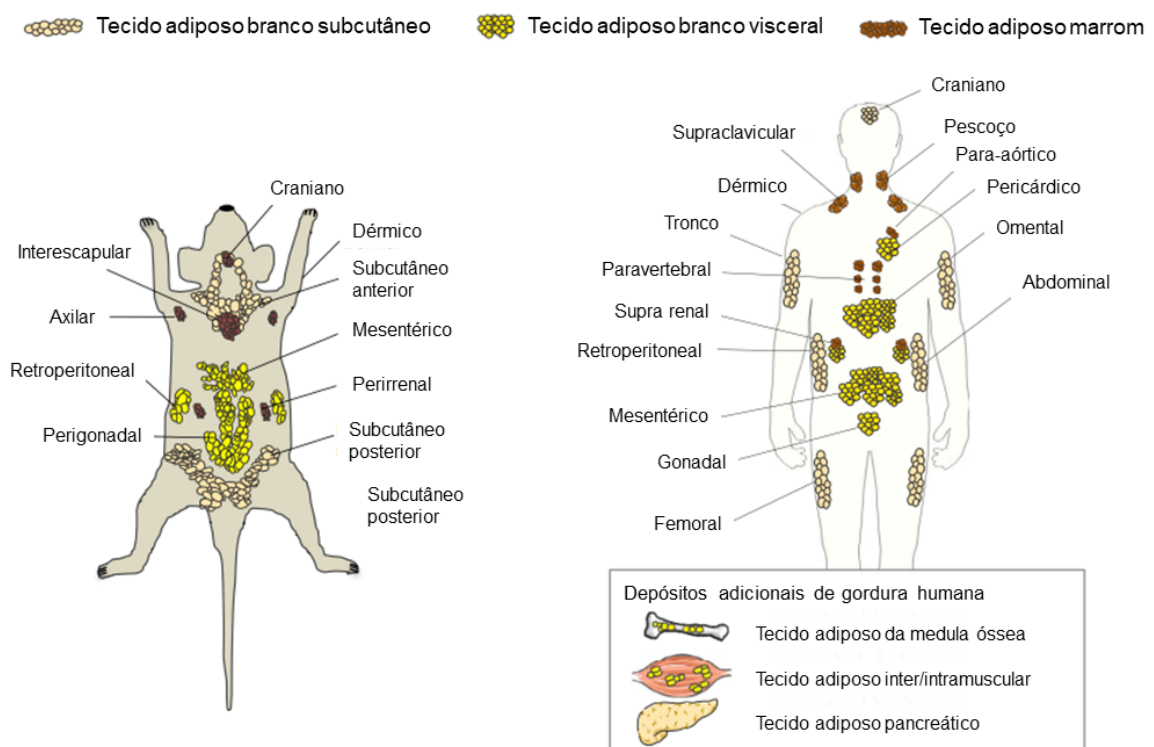


Figura 7. Depósitos de tecido adiposo. Fonte: Adaptado de Schoettl; Fischer; Ussar (2018).

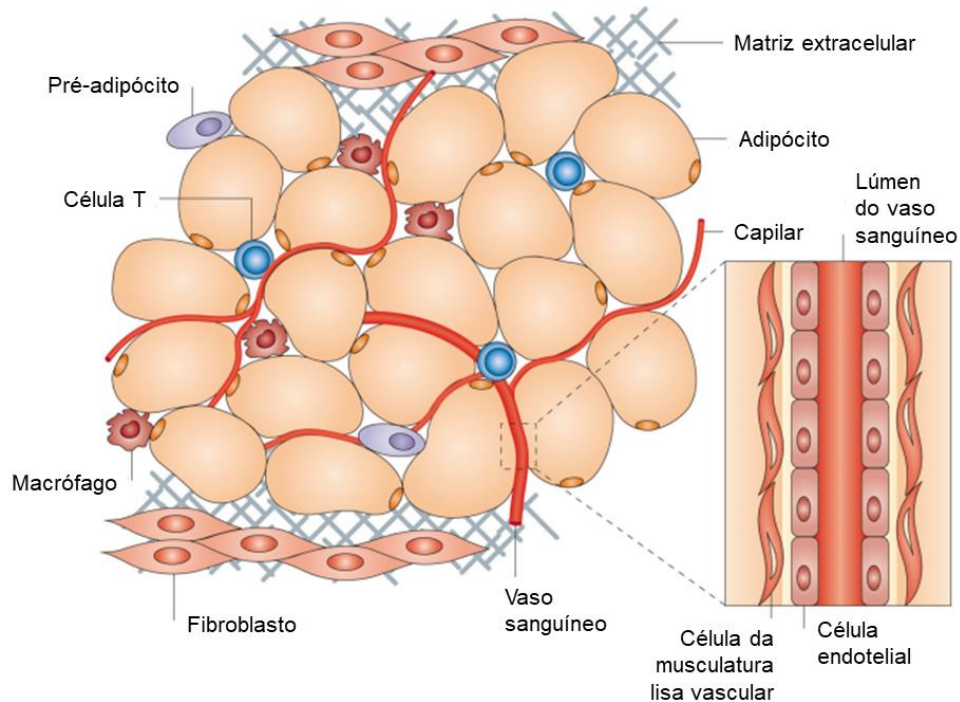


Figura 8. Componentes celulares do tecido adiposo branco. Fonte: Adaptado de Ouchi et al. (2011).

Como visto, uma importante característica do TAB é a sua heterogeneidade morfofuncional, relacionada tanto à localização anatômica dos depósitos, como aos tipos celulares (KWOK; LAM; XU, 2016). Portanto, diferentes depósitos de TAB, e até mesmo, adipócitos do mesmo depósito podem ter propriedades funcionais muito diferentes, o que influencia o comportamento geral do tecido adiposo (SANCHEZ-GURMACHES, HUNG; GUERTIN, 2016). Esta organização é essencial para a manutenção da função e homeostase do TA, permitindo aspectos anatômicos particulares, vascularização e inervação específica, e intrincada citologia e plasticidade fisiológica (SEELAENDER; BATISTA JÚNIOR, 2014).

Considerando que o tumor é um tecido altamente energético, para seu crescimento e manutenção é necessária uma reprogramação metabólica sistêmica do hospedeiro (AL-ZHOUGHBI et al., 2014; DEBERARDINIS et al., 2008). Por meio da produção e secreção de adipocinas pró-inflamatórias pelos adipócitos e células da FVE, o TAB, em especial, é um compartimento que contribui para a progressão da caquexia associada ao câncer (NEVES et al., 2016; PEINADO et al., 2010). As adipocinas, por sua vez, atuam tanto de maneira autócrina e parácrina, como de forma endócrina (TORRES-LEAL et al., 2010).

Em condições fisiológicas, a função secretória do TAB é controlada precisamente, entretanto, na vigência de alguma patologia, como obesidade e caquexia, existe um aumento na síntese de citocinas e adipocinas, seguida por maior infiltração de macrófagos (SEELAENDER; BATISTA JÚNIOR, 2014). Dentre as citocinas e adipocinas, incluem-se: TNF- α , IL-1, IL-6, proteína 1 quimiotática de monócito (MCP-1), adiponectina e leptina, que podem ser utilizadas como marcadores de um possível diagnóstico e da gravidade da síndrome (TRAYHURN; WOOD, 2004). Logo, o TAB tanto tem sua homeostase afetada pela caquexia, como também influencia fortemente a etiologia da mesma (BATISTA JÚNIOR et al., 2013).

A expressão das citocinas e quimiocinas inflamatórias envolvidas no processo de caquexia é controlada pela ativação do fator de transcrição NF-kB (SUGANAMI; TANAKA; OGAWA, 2012). Além disso, o incremento na síntese de TNF- α e de IL-6, em consequência à ativação da via do NF-kB, promove o desequilíbrio no metabolismo lipídico e o aumento da lipólise no TAB (CAMARGO et al., 2015). Assim, o fator NF-kB é considerado um potencial alvo para as estratégias de tratamento do câncer (GARG; AGGARWAL, 2002).

Alguns estudos têm demonstrado que a perda de gordura corporal durante a caquexia precede a perda muscular, além de estar relacionada diretamente a um menor tempo de sobrevivência (EBADI; MAZURAK, 2014; MURPHY et al., 2010; FOULADIUN et al., 2005). Embora os mecanismos básicos envolvidos na redução do tecido adiposo não sejam totalmente compreendidos, alguns fatores podem explicar, como 1) aumento da mobilização lipídica por meio do incremento da lipólise nos adipócitos, 2) redução da lipogênese e 3) prejuízo no processo de adipogênese (BATISTA JÚNIOR et al., 2012).

Durante a caquexia, a hidrólise de lipídios exógenos pela enzima lipase lipoproteica (LPL) encontra-se reduzida, porém os estoques corporais de gordura são utilizados como consequência do aumento da mobilização e oxidação de lipídios (NICOLINI et al., 2013). Além de participar das reações de lipólise, a LPL é importante para o processo de lipogênese *de novo*, do qual os triglicerídeos são formados a partir de derivados glicídicos, de forma que uma menor atividade da enzima promove menor depuração de lipídeos e conseqüentemente maior trigliceridemia (POLACOW; LANCHETA JÚNIOR, 2007). A adipogênese, por sua vez, é dificultada pela maior produção de TNF- α na caquexia associada ao câncer, o que produz adipócitos de menor tamanho (EBADI; MAZURAK, 2014).

No tecido adiposo, cada adipócito é encoberto por uma delicada matriz extracelular (MEC) que confere estrutura e elasticidade ao tecido (MARIMAN; WANG, 2010). Qualquer alteração na morfologia celular é acompanhada por modificação da expressão dos componentes dessa estrutura (HALBERG; WERNSTEDT; SCHERER, 2008). O rearranjo morfológico do TAB em conjunto com a infiltração de macrófagos, observados na caquexia, leva à síntese excessiva de constituintes da MEC e consequente fibrose do tecido (BATISTA JÚNIOR et al., 2016). Dessa forma, a fibrose é resultado da resposta inflamatória persistente e a deposição descontrolada de proteínas da MEC pode impedir a expansão dos adipócitos, levando ao fracasso de tratamentos destinados à pacientes com caquexia (ALVES et al., 2017).

Além dos depósitos viscerais e subcutâneos, tem sido sugerida a participação do tecido adiposo peritumoral na iniciação, progressão e resposta ao tratamento do câncer (ZOICO et al., 2017). TA peritumoral é, na verdade, tecido adiposo visceral que se encontra adjacente ao tumor, e por isso, pode sofrer algumas alterações moleculares e fenotípicas devido reprogramação pelas células tumorais (GUAITA-ESTERUELAS et al., 2018). Tais modificações estabelecem que o tecido adiposo peritumoral faça parte do microambiente tumoral, e desencadeie uma ativação cruzada (do inglês, *crosstalk*) entre eles (DIRAT et al., 2010).

A interação entre o tecido adiposo e as células tumorais pode levar a uma transdiferenciação dos adipócitos em pré-adipócitos ou reprogramá-los a adipócitos associados ao câncer, os quais promovem superexpressão de citocinas pró-inflamatórias (NIEMAN et al., 2013). Neste contexto, Pinto Neto et al. (2018) observaram que o tecido peritumoral de pacientes caquéticos apresentou condições pró inflamatórias mais pronunciadas que o de pacientes com peso estável. Em suma, pelos eventos observados em alguns estudos é possível inferir que 1) as células tumorais alteram o depósito de TA adjacente induzindo fibrose, angiogênese e inflamação e, por sua vez, 2) o TA peritumoral favorece a progressão do tumor (ZOICO et al., 2017; AMOR et al., 2016; WAGNER et al., 2012).

2.6 Tecido adiposo marrom e *browning* na caquexia

Diferente do tecido adiposo branco (TAB), que apresenta adipócitos com grandes partículas de gordura uniloculares, o tecido adiposo marrom (TAM) contém adipócitos com múltiplas gotículas lipídicas, que permitem a rápida mobilização de

triglicerídeos e favorecem a lipólise (KEIPERT; JASTROCH, 2014). Sua cor marrom é resultante da alta densidade de mitocôndrias e da ampla vascularização, o que contribui para a elevada capacidade oxidativa desse tecido (JASTROCH; OELKRUG; KEIPERT; 2018). O TAM é especializado na dissipação de energia, na forma de calor, que é derivada dos nutrientes por meio da ação da proteína desacopladora 1 (UCP1), localizada na membrana interna da mitocôndria (CANNON; NEDERGAARD, 2004).

Além do TAB e do TAM, o tecido adiposo bege representa um terceiro tipo de células adiposas em roedores, o qual é composto por agrupamentos de adipócitos brancos que adotaram características de gordura marrom em resposta a estímulos (OELKRUG; POLYMEROPOULOS; JASTROCH, 2015). Semelhante ao TAM, os adipócitos beges são caracterizados por uma morfologia lipídica multilocular, alto conteúdo de mitocôndrias, expressão de UCP1 e vascularização (HARMS; SEALE, 2013) (**Figura 9**).

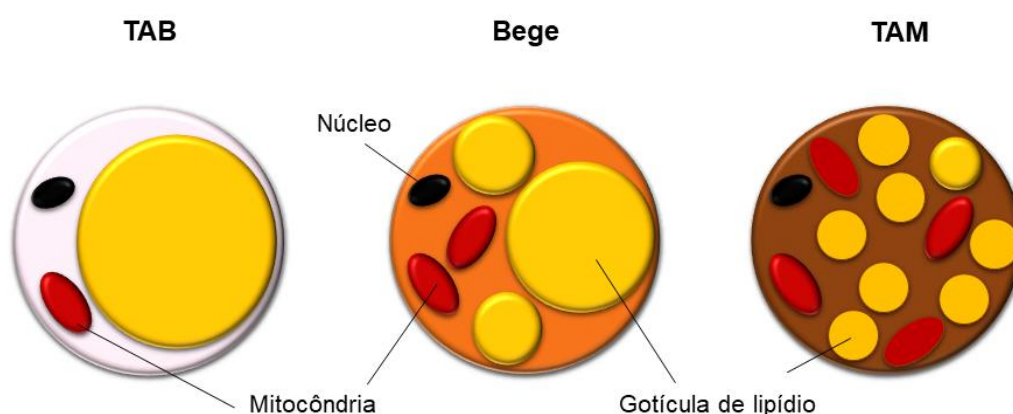


Figura 9. Representação das características morfológicas de adipócitos branco, bege e marrom. Legenda: TAB = tecido adiposo branco; TAM= tecido adiposo marrom. Fonte: Adaptado de Kwok; Lam; Xu (2016).

Apenas os mamíferos, em especial roedores e humanos bebês, possuem TAM (JASTROCH; OELKRUG; KEIPERT; 2018). Nos roedores, os adipócitos marrons são encontrados em depósitos distintos de algumas regiões, tais como interescapular, perirrenal, para-aórtica, dentre outras (SIDOSSIS; KAJIMURA, 2015). O TAM da região interescapular é o principal depósito utilizado nos estudos experimentais, por ser facilmente identificado, dissecado, e por permitir distribuição de calor para todo o corpo (OELKRUG; POLYMEROPOULOS; JASTROCH, 2015). Nos bebês, a formação

desse tecido é finalizada ainda na fase pré-natal, o que permite a manutenção da temperatura após o nascimento (SIDOSSIS; KAJIMURA, 2015). Em adultos, nos últimos anos, tem-se observado depósitos de tecido adiposo marrom metabolicamente ativos nas regiões cervical, supraclavicular, axilar e paravertebral (NEDERGAARD; BENGTSSON; CANNON, 2007) (**Figura 10**).

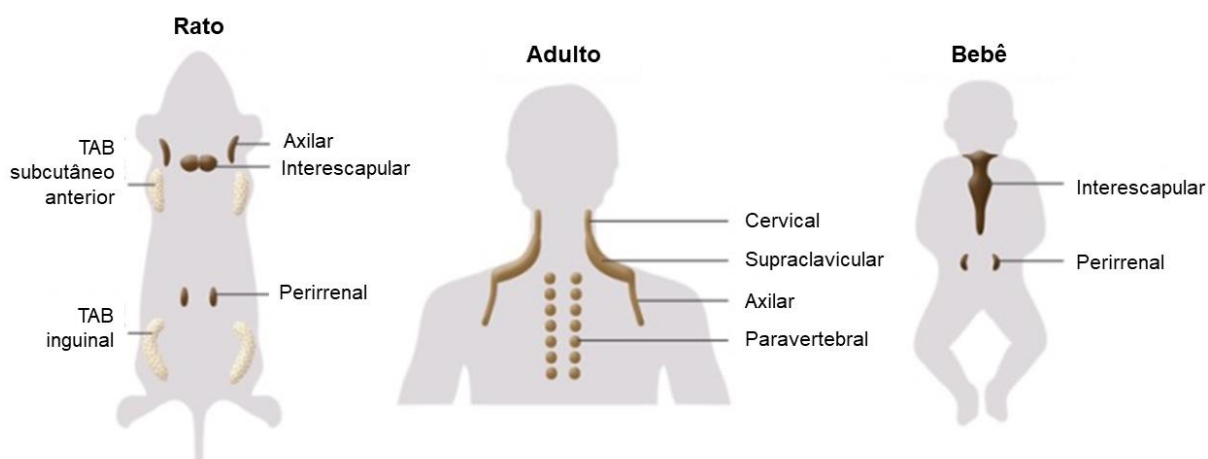


Figura 10. Localização anatômica dos adipócitos termogênicos em ratos e humanos. Legenda: TAB = tecido adiposo branco. Fonte: Adaptado de Sidossis; Kajimura (2015).

Por outro lado, os adipócitos beges estão localizados principalmente no TAB subcutâneo dos roedores, e o seu desenvolvimento é induzido em resposta a certos fenômenos externos, como exposição prolongada ao frio, exercício físico e tratamento com agonistas β_3 -adrenérgicos (KAJIMURA; SAITO, 2014; WU; COHEN; SPIEGELMAN, 2013). O fenômeno pelo qual os adipócitos brancos assumem características de tecido adiposo marrom é conhecido como *browning* (CONTRERAS et al., 2017). O processo de *browning* correlaciona-se positivamente com o incremento do metabolismo, como consequência do aumento do gasto de energia e da perda de massa corporal (KWOK; LAM; XU, 2016).

Na caquexia, evidencia-se, tanto em estudos clínicos como em modelos animais, o aumento do gasto energético de repouso, e o tecido adiposo tem sido apontado como principal responsável, com destaque para os tecidos marrom e bege contribuindo para o incremento da termogênese (VAITKUS; CELI, 2017; TSOLI et al., 2012; HYLANDER et al., 2000). As citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-6 e IL-1, por meio de ação central, parecem estar envolvidas na ativação do TAM observada na caquexia associada ao câncer (TSOLI; SWARBRICK; ROBERTSON, 2016). O TNF-

α , por exemplo, influencia a expressão de vias de sinalização hipotalâmicas, resultando no aumento da atividade simpática no TAM, induzindo biogênese mitocondrial e expressão de UCP1, o que promove aumento na temperatura corporal, no consumo de oxigênio e no gasto de energia (ARRUDA et al., 2010).

Como mencionado, a via β -adrenérgica encontra-se estimulada na caquexia e é responsável por uma maior atividade, principalmente, do depósito interescapular do tecido adiposo marrom de ratos (DONG et al., 2017; PETRUZZELLI et al., 2014). A sinalização das catecolaminas leva ao aumento da expressão de UCP1, que induz termogênese, por interferir no fluxo de elétrons da fosforilação oxidativa, gerando calor ao invés de ATP (ROHM et al., 2019; DAAS; RIZEQ; NASRALLAH, 2018). Da mesma forma, outros genes relacionados ao metabolismo lipídico e as vias termogênicas, incluindo coativador gama de receptor ativado por proliferador de peroxissoma 1 alfa (PGC1 α), receptor ativado por proliferador de peroxissoma (PPAR) e iodotironina deiodinase (DIO), apresentaram expressão alterada na caquexia (KLIOWER et al., 2015).

Atrelado a isso, tem-se observado correlação positiva entre uma maior ativação de receptores adrenérgicos e a atividade das principais enzimas envolvidas no processo de lipólise, a citar: lipase de triacilglicerol do adipócito (ATGL), lipase hormônio sensível (HSL) e lipase de monoacilglicerol (MGL) (PORPORATO, 2016; CAO et al., 2010). Outrossim, demonstra-se que a lipólise induz a ativação do TAM interescapular durante a caquexia, contribuindo ainda mais para o desacoplamento de energia na mitocôndria, com a subsequente piora do balanço energético (PRETUZZELI; WAGNER, 2016). Entretanto, o tecido adiposo marrom é limitado em massa, localizado em pequenos depósitos no corpo, assim, é questionável sua capacidade de contribuir substancialmente para o aumento do gasto energético na caquexia associada ao câncer (ROHM et al., 2019).

O TAB, por outro lado, está distribuído em grandes depósitos, então a expansão de adipócitos beges nesse tecido pode colaborar com um aumento no gasto de energia e contribuir significativamente para a caquexia (VAITKUS; CELI, 2017). Naturalmente, o *browning* foi identificado em pacientes com câncer e em modelos de caquexia portadores de tumor (ARGILÉS et al., 2018; KIR et al., 2014; FRONTINI et al., 2013). Mais uma vez, observa-se o aumento da expressão de UCP1, a atividade de citocinas pró-inflamatórias e a ativação de receptores β 3-adrenérgicos participando do processo de formação de tecido adiposo bege (DALAL, 2018) (**Figura 11**).

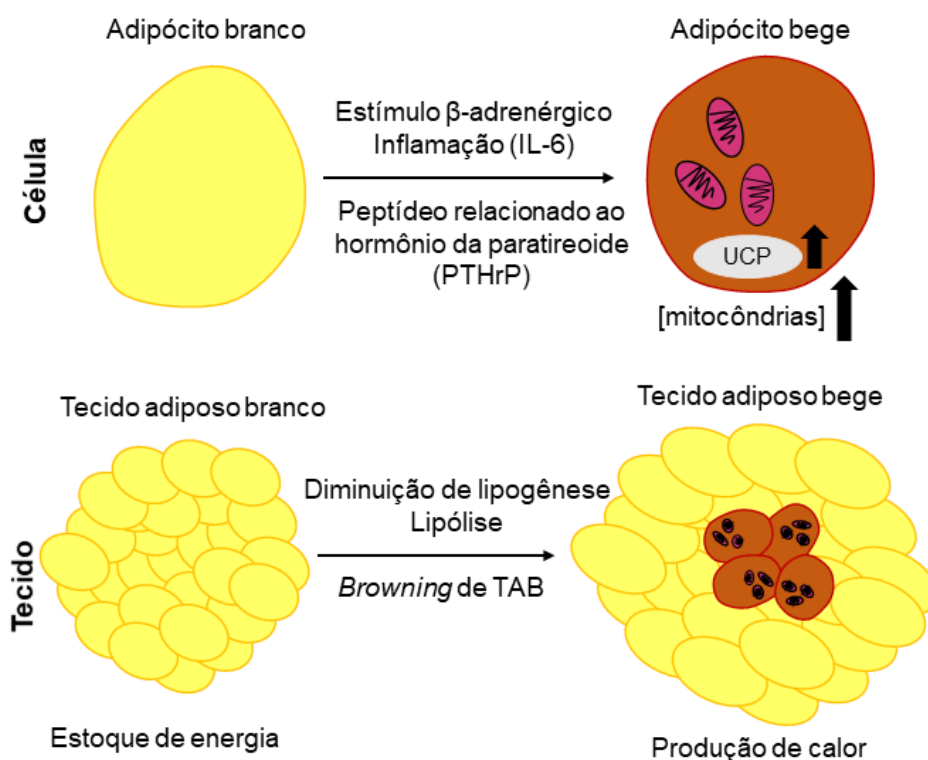


Figura 11. Mecanismos envolvidos no browning do tecido adiposo branco na caquexia associada ao câncer. Legenda: IL-6 = interleucina-6; UCP1 = proteína desacopladora 1; [mitocôndrias] = concentração de mitocôndrias; TAB = tecido adiposo branco. Fonte: Adaptado de Pretuzzeli; Wagner (2016).

A liberação de fatores pró-inflamatórios, pelo sistema imune do hospedeiro ou pelo tumor, contribuem para o aumento da expressão de UCP1, decorrente da mudança de tecido adiposo branco para marrom (DAAS; RIZEQ; NASRALLAH, 2018; PORPORATO, 2016). O aumento da atividade termogênica do tecido adiposo contribui para o gasto energético acelerado e para a perda de peso em modelos de caquexia (KIR; SPIEGELMAN, 2016). O estudo de Petruzzelli et al. (2014) demonstrou que o uso de um bloqueador de IL-6 ou de células tumorais que não expressam essa citocina reduziu, mas não suprimiu completamente a caquexia.

Adicionalmente, o peptídeo relacionado ao hormônio da paratireoide (PTHrP), secretado pelo tumor, altera a termogênese por meio do *browning* (BARACOS et al., 2018; DALAL, 2018). O PTHrP modula o gasto de energia no tecido adiposo e contribui para aspectos mais amplos da caquexia, porém, a injeção do anticorpo anti-PTHrP em camundongos inibiu o *browning* e a perda de massa muscular (KIR et al.,

2014). Na caquexia também é evidenciado o aumento da expressão de outros genes importantes para o desenvolvimento do tecido adiposo bege, como PGC1 α e proteína contendo domínio PR 16 (PRDM16), e a ativação da via β 3-adrenérgica (DONG et al., 2017; VAITKUS; CELI, 2017). De forma que a deficiência de PRDM16 e o bloqueio dos receptores β 3 reduz a expressão de UCP1, o escurecimento do tecido adiposo e a termogênese (DALAL et al; 2018; PRETUZZELI; WAGNER, 2016).

Por fim, o *browning* parece ser um evento de manifestação precoce na caquexia associada ao câncer, e contribui para o aumento do gasto energético e para mobilização de ácidos graxos pelos adipócitos, levando à disfunção metabólica característica da síndrome (DAAS; RIZEQ; NASRALLAH, 2018; BATISTA JÚNIOR; HENRIQUES, 2018; ABDULLAHI; JESCHKE; 2017).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

- Investigar os efeitos da caquexia induzida pelo câncer sobre o balanço energético em animais portadores de modelo tumoral Yoshida AH-130.

3.2 Específicos

- Caracterizar o quadro de caquexia associada ao câncer;
- Avaliar as alterações da caquexia sobre a ingestão alimentar;
- Estudar o comportamento do tecido adiposo branco e marrom, em relação à massa e aos aspectos morfológicos;
- Analisar o padrão da expressão gênica de fatores termogênicos e lipogênicos no TAB epididimal;
- Determinar a temperatura da região interescapular do tecido adiposo marrom ao longo do experimento.

4 METODOLOGIA

4.1 Aspectos éticos

Todos os procedimentos realizados seguiram os princípios éticos adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e as normas de cuidado e utilização de animais para a prática científica definidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). A pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Piauí (UFPI), sob o protocolo de número 432/18.

4.2 Animais

Foram utilizados ratos machos e adultos jovens da espécie *Rattus norvegicus albinus*, linhagem *Wistar*, provenientes do Biotério do Centro de Ciências Agrárias (CCA) da UFPI. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas (LIDFORS et al., 2014; SHARP et al., 2002) de polipropileno, forradas por maravalha, com livre acesso à água filtrada e ração para ratos (PRESENCE®), em ambiente climatizado a 22 ± 2 °C, umidade relativa de $55 \pm 10\%$ e ciclo biológico de 12 horas no claro e 12 horas no escuro (luzes acesas às 6 horas da manhã).

4.3 Inoculação de células tumorais

4.3.1 Melhoramento da viabilidade das células tumorais

As células de hepatoma ascítico Yoshida AH-130 foram doadas pelo Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP) e permaneceram armazenadas em nitrogênio líquido até o momento da inoculação. Quando necessárias, as células foram submetidas a um processo gradual de descongelamento.

Inicialmente, um volume de 2 mL de células tumorais foi inoculado via intraperitoneal em dois animais previamente selecionados. A partir daí, monitorou-se, diariamente, por sete dias, a manifestação de alguns sinais, tais como: ascite, perda de pelos, muco excessivo ao redor dos olhos e embranquecimento das orelhas. Em

seguida, os mesmos foram anestesiados por meio de solução inalante (isoflurano®) e 2 mL de volume tumoral foi coletado e novamente transferido para outros animais. Este procedimento foi repetido quatro vezes, por quatro semanas consecutivas e, consiste em uma técnica de passagem de células *in vivo* (CINOSI et al., 2011), cujo objetivo é o melhoramento da qualidade das células tumorais.

4.3.2 Inoculação de células tumorais viáveis

Ao final do processo de melhoramento da viabilidade, as células Yoshida AH-130 foram adicionadas à solução tampão fosfato salina (PBS). De forma que 30 mL de volume tumoral foram coletados de ratos portadores de tumor e em seguida acrescentados à 10 mL de PBS. Da solução final foram recolhidos 2 mL para inoculação nos animais do grupo experimental. Segundo Toledo et al. (2016), esse volume permite a inoculação de 10^8 células tumorais, obtidas de tumor abdominal em crescimento exponencial, que são necessárias para a indução de caquexia.

4.4 Desenho experimental

Os animais foram distribuídos de forma randomizada em dois grupos experimentais: a) Controle (n = 9) e b) Tumor (n = 8). Inicialmente (dia 0), foi inoculada a quantidade de 10^8 células tumorais via intraperitoneal no grupo tumor, da mesma forma que ao grupo controle foi administrado substância veículo (PBS). Os ratos foram monitorados durante os sete dias de protocolo e, diariamente, no mesmo horário, a massa corporal e o consumo de ração foram avaliados e registrados em planilha. Além disso, a captura de imagens termográficas foi realizada nos tempos 0, 4 e 7 dias (**Figura 12**). Ao final do período experimental, os animais foram mantidos em jejum por 8 horas, com livre acesso à água e em seguida, eutanasiados com sobredose de coquetel de anestésicos. Após eutanásia, a massa tumoral foi mensurada e o TAB epididimal (EPI), o retroperitoneal (RET) e o mesentérico (MES), além do tecido adiposo marrom (TAM) e o músculo gastrocnêmio foram coletados, pesados e armazenados em *freezer* a - 80 °C.

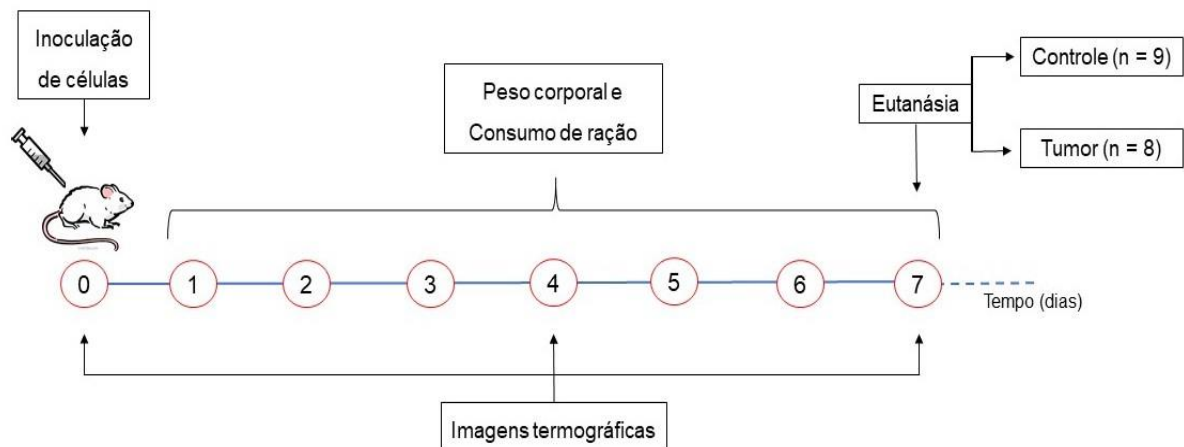


Figura 12. Desenho experimental do estudo da caquexia. Fonte: própria.

4.5 Avaliação do consumo de ração

O consumo de ração foi avaliado diariamente no mesmo horário pela manhã, durante todo o período do protocolo (7 dias). A quantidade em gramas de ração ingerida por animal foi determinada a partir da média de consumo encontrada para cada gaiola (SUN et al., 2016). As gaiolas alojaram entre 2 e 3 animais, de forma que foi ofertado uma quantidade de 40g/animal/dia. No dia seguinte à oferta, as sobras de ração foram pesadas com auxílio de balança semi-analítica (Exacta, BL-320AB-BI, Brasil) e registradas para compor o cálculo do consumo alimentar (**Quadro 1**).

$$CR (g) = \frac{\text{oferta de ração} - \text{sobra de ração}}{n \text{ de animais por gaiola}}$$

Quadro 1. Cálculo do consumo de ração por animal. Legenda: CR = consumo de ração; g = gramas; n = número. Fonte: Adaptado de Sun et al. (2016).

Mediante o cálculo do consumo por animal, determinou-se o consumo de ração acumulado, a média total de consumo e o consumo diário relativo.

4.6 Avaliação da massa corporal

Diariamente, os animais foram pesados por meio de balança digital (Sf-400) e a variação (Δ) da massa corporal em gramas foi determinada a partir da diferença

entre a massa corporal ao final dos dias de protocolo e a massa corporal no dia 0 (**Quadro 2**). A massa final foi considerada após retirada da massa do tumor.

$$\Delta MC \text{ (g)} = (MCf - MT) - MCi$$

Quadro 2. Cálculo da variação da massa corporal. Legenda: ΔMC = delta da massa corporal; g = gramas; MCf = massa corporal final; MT = massa do tumor; MCi = massa corporal inicial. Fonte: própria.

4.7 Cálculo do índice de caquexia

A porcentagem de perda de massa corporal foi determinada a partir do cálculo do índice de caquexia de acordo com a equação abaixo (**Quadro 3**).

$$IC \text{ (\%)} = \left[\frac{MCi - MCf + MT + \Delta MC_{cont.}}{MCi + \Delta MC_{cont.}} \right] \times 100$$

Quadro 3. Equação do índice de caquexia. Legenda: IC = índice de caquexia; MCi = massa corporal inicial; MCf = massa corporal final; MT = massa do tumor; $\Delta MC_{cont.}$ = ganho de massa corporal do grupo controle. Fonte: Adaptado de Voltarelli et al. (2017).

Os animais foram considerados caquéticos quando o índice de caquexia foi maior que 10% (MARTINS et al., 2017).

4.8 Cálculo da eficiência metabólica

A eficiência metabólica (EM) determina a relação entre o consumo alimentar e o ganho de massa corporal. Nesse estudo, a EM foi calculada pela variação da massa corporal para cada 10g de ração consumida (**Quadro 4**).

$$EM (g) = \frac{\Delta MC}{CR} \times 10$$

Quadro 4. Cálculo da eficiência metabólica. Legenda: EM = eficiência metabólica; g = gramas; ΔMC = delta da massa corporal; CR = consumo de ração. Fonte: Adaptado de Iossa et al. (2003).

4.9 Determinação da temperatura no tecido adiposo marrom

A temperatura da pele ao redor do tecido adiposo marrom (TAM) foi registrada por meio de câmera infravermelha (Câmera de Imagem Térmica Infravermelha Compacta; FLIR; West Malling, Kent, Reino Unido) nos tempos 0, 4 e 7 dias de experimento. As imagens termográficas capturadas foram analisadas com um pacote de software específico (FLIR-Tools-Software, FLIR; West Malling, Kent, Reino Unido). Para cada imagem, a área em torno do TAM foi delimitada e a temperatura média da região foi calculada como a média de 3 (triplicata) imagens por animal (MARTÍNEZ-SÁNCHEZ et al., 2017). Para tanto, os animais foram previamente tricotomizados (região interescapular) com o auxílio de aparelho de barbear disponível no mercado, nos dias anteriores à captura das imagens (**Figura 13**).



Figura 13. Região da pele sem pelos para captura das imagens termográficas. Fonte: própria.

4.10 Eutanásia dos animais

Para minimizar a influência aguda do estado prandial nos resultados experimentais e estabelecer um estado metabólico semelhante, todos os animais

foram mantidos em jejum durante as 8 horas prévias ao início da eutanásia. Os animais foram eutanasiados com coquetel de lidocaína/tiopental (lidocaína 10 mg/Kg e tiopental 150 mg/Kg) por meio de injeção via intraperitoneal.

4.11 Obtenção da massa tumoral e dos tecidos

Com o animal anestesiado e imediatamente antes da eutanásia, realizou-se uma pequena incisão na região abdominal e o tumor líquido foi cuidadosamente coletado em béquer e pesado em balança analítica (Exacta, EL-320AB-BI, Brasil).

Logo após a eutanásia, o TAB EPI, o RET e o MES, além do TAM e o músculo gastrocnêmio foram coletados e pesados em balança semi-analítica (Exacta, EL-320AB-BI, Brasil). Os dados de massa dos tecidos estão expressos em valor relativo, ou seja, foram calculados para cada 100g de massa corporal final (considerada após retirada da massa do tumor) (**Quadro 5**).

$$MR_{tec.} (g) = \frac{MA_{tec.}}{(MCf - MT)} \times 100$$

Quadro 5. Determinação da massa relativa dos tecidos. Legenda: MRtec = massa relativa do tecido; g = gramas; MAtec = massa absoluta do tecido; MCf = massa corporal final; MT = massa do tumor. Fonte: Adaptado de Antunes et al. (2018).

Após pesagem, foram extraídas amostras de cada tecido e distribuídas em tubos do tipo *ependorf*. Os tubos contendo amostras destinadas à análise de expressão gênica foram armazenados à - 80 °C. Enquanto as amostras destinadas à análise histológica foram mantidas em solução de paraformaldeído 4% em PBS por 24 horas e em seguida, transferidas à solução de álcool 70° INPM (grau INPM, Instituto Nacional de Massas e Medidas) (**Figura 14**).

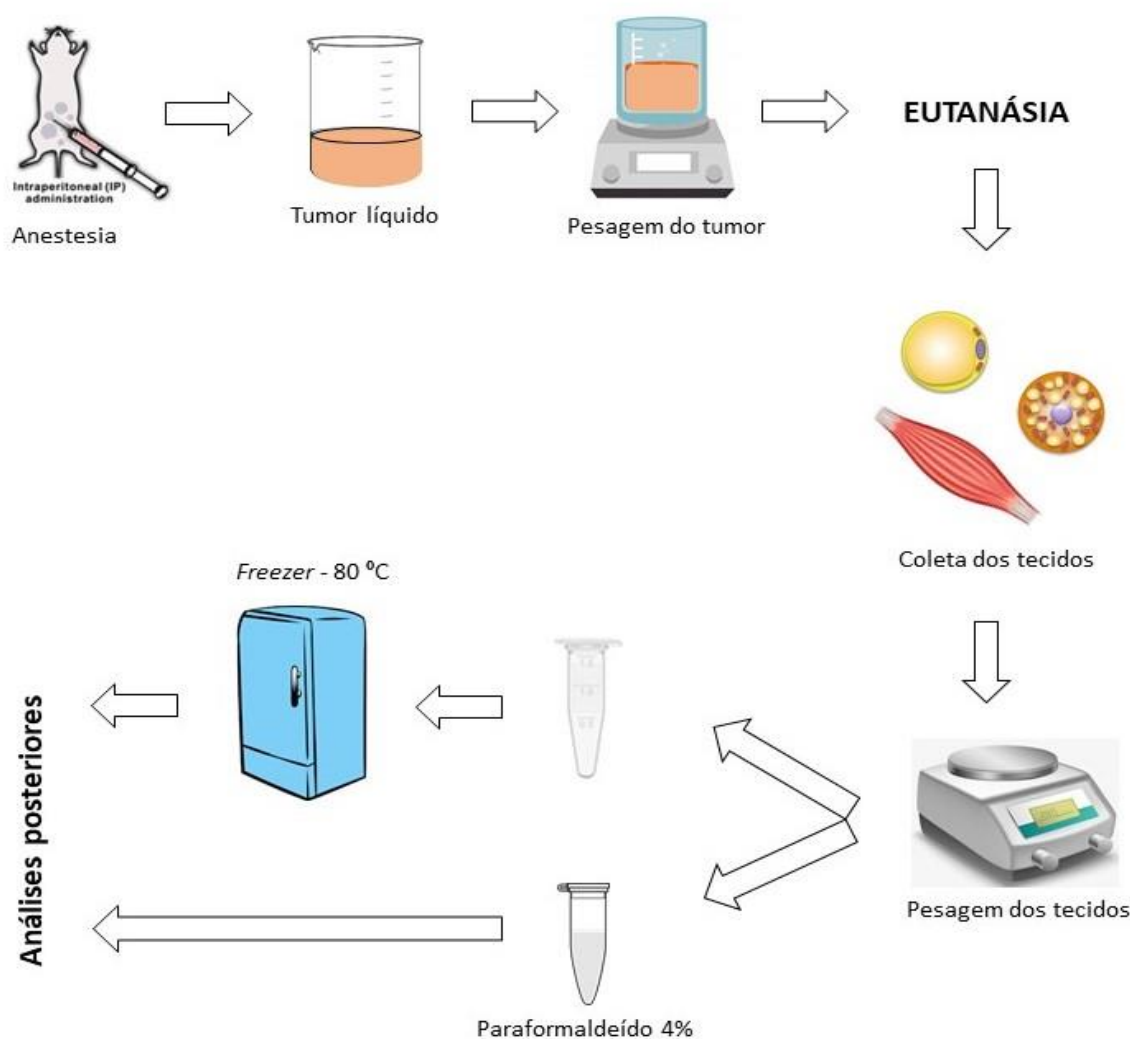


Figura 14. Esquema de coleta do tumor e dos tecidos. Fonte: própria.

4.12 Análise histológica

4.12.1 Obtenção e processamento dos tecidos

As amostras dos diferentes depósitos de TAB (EPI, RETRO e MES) e de TAM foram fixadas em paraformaldeído a 4% por 24 horas. Após fixadas, foram então desidratadas com concentrações crescentes de etanol (70, 95 e 100%) e em seguida à desidratação, as amostras foram compensadas em banhos de xilol e mergulhadas em parafina (Paraplast X-tra, SEM) para inclusão. Todo o procedimento teve duração de 12 horas e foi executado no histotécnico (Leica®). Decorrido esse tempo, as amostras foram montadas em blocos de parafina para realização da microtomia, de

forma que foram feitos cortes de 3 μm de espessura e colocados sobre as lâminas. Técnica adaptada de Silvério et al. (2017).

4.12.2 Desparafinização e hidratação

Os cortes foram colocados em estufa a 70 °C e em seguida, desparafinizados com sucessivos banhos de xilol, hidratados em concentrações decrescentes de álcool (100, 95 e 70%) e lavados em água destilada.

4.12.3 Coloração com Hematoxilina e Eosina (H&E)

A coloração com H&E foi realizada em cestos metálicos da seguinte forma: i) 7 minutos com hematoxilina; e ii) 3 minutos com eosina. Após o processo de coloração, as lâminas foram fechadas com lamínulas e seladas com resina.

4.12.4 Análise das imagens

As imagens teciduais foram obtidas com aumento de 40x em microscópio de luz (Olympus CX41), gravadas em câmera digital (Olympus SC30) e exibidas em monitor de alta resolução (LG, Flatron, E2011P).

4.13 Avaliação da expressão de genes

Para a análise da influência da caquexia sobre a expressão de genes relacionados ao balanço energético, foi utilizada a técnica de reação em cadeia de polimerase quantitativa em tempo real (qPCR-RT), cujo procedimento foi adaptado de Norren et al (2015). Com base nos resultados de massa dos tecidos coletados, optamos por realizar este protocolo apenas no TAB EPI, por ter demonstrado alterações significativas e robustas quando comparado aos demais. As análises de expressão gênica foram realizadas no Laboratório de Metabolismo de Lipídios no Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

4.13.1 Extração de RNA total

Para isolar o RNA total do tecido adiposo branco epididimal, as amostras de aproximadamente 15 mg, foram homogeneizadas em 1 mL solução de Trizol® (Invitrogen, Carlsbad, CA). Após essa etapa, foram adicionados 0,2 mL de clorofórmio ao homogeneizado e, posteriormente realizada uma centrifugação a 15.100 G (4 °C, 15 minutos), para recuperação da fase aquosa superior. A esta, foram adicionados 500 µL de álcool isopropílico e em seguida, realizada nova centrifugação (15.100 G, 4 °C, 10 minutos) para obtenção do precipitado. Descartou-se o sobrenadante, ao pellet foi adicionado 1 mL de etanol 95% e realizou-se centrifugação a 10.700 G (4 °C, 5 minutos). O sobrenadante foi novamente descartado e o procedimento de lavagem com etanol 95% foi repetido. Após secagem, o precipitado final, sem resíduo de etanol, foi ressuscitado em 30 µL de água ultrapura (Sigma®).

A integridade do RNA foi verificada por eletroforese, com gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídio. A leitura da concentração do RNA total foi realizada em espectrofotômetro do tipo Nanodrop (Biotek® Synergy/H1) no comprimento de onda de 260/280 nm.

4.13.2 Reação de transcrição reversa

As amostras contendo 2 µg de RNA total foram adicionadas de água ultrapura e incubadas por 10 minutos a 65 °C para desnaturação. Em seguida foram submetidas à reação de transcrição reversa. Para tanto, foi adicionado em cada amostra o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Invitrogen) com o volume final de 14 µL. As reações foram realizadas em ciclo único sob as condições de tempo e temperatura que seguem: i) 10 minutos a 25°C; ii) 120 minutos a 37 °C; iii) 5 minutos a 85 °C; e iv) resfriamento a 4 °C. Por fim, as amostras de DNA complementar (cDNA) foram armazenadas a - 20 °C.

4.13.3 Seleção dos *primers*

Os *primers* foram sintetizados pela *Applied Biosystems* (Thermo Fisher Scientific, Foster City, CA). Para determinar a sequência do *primer* utilizou-se o *Genbank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>). Além disso, foram selecionados os candidatos a *primer* de acordo com os seguintes critérios: i) comprimento entre 18 e 24 pares de bases (bp); ii) T_m entre 58 e 62 °C; iii) comprimento do produto

amplificado entre 100 e 150 bp; e iv) as sequências *Sense* e *Antisense* nunca devem sair do mesmo éxon. Para determinar a especificidades do *primer*, as sequências foram comparadas com o *Genbank* usando o programa *Blast* (disponível em www.ncbi.nlm.nih.gov).

4.13.4 Reação em cadeia de polimerase quantitativa em tempo real (qPCR-RT)

A expressão dos genes (**Tabela 2**) foi quantificada por qPCR-RT em Termociclador QuantStudio™ 12k Flex e SYBR Green como marcador de fluorescência (Applied Biosystems, Foster City, CA). Para reação foram utilizados 2 µL de cDNA da amostra para um volume final de 10 µL. A concentração de cDNA foi de 10 ng por amostra e foi utilizado um intervalo de 200-800 nM de acordo com o *primer*, utilizando 5 µL do mix SYBR Green, que contém dNTP tampão de reação, Taq DNA polimerase SYBR green. A reação ocorreu do seguinte modo: primeiramente, um ciclo de 50 °C por 2 minutos e 95 °C por 10 minutos; seguido de 40 ciclos de amplificação: i) desnaturação a 95 °C por 15 segundos, ii) anelamento a 63 °C por 60 segundos e iii) extensão a 72 °C, por 2 minutos.

Para análise dos resultados foram calculados os valores do limiar de ciclagem (ΔCt) para cada gene de interesse ($\Delta Ct = Ct \text{ gene de interesse} - Ct \text{ gene constitutivo}$). A partir de teste inicial realizado com dois genes constitutivos, hipoxantina fosforribosiltransferase 1 (HPRT1) e proteína ribossômica L32 (RPL32) utilizou-se como normalizador aquele que apresentou menor variabilidade entre as amostras. Os resultados foram expressos com base na relação do mRNA de cada gene de interesse, relativizado com o conteúdo de mRNA do gene constitutivo selecionado (HPRT1).

| Gene | n acesso | Sense | Massa |
|---------------|-------------|--|-------|
| | | Antisense | |
| UCP1 | NM_012682.2 | CCGAGCCAAGATGGTGAGTT CCTTGGATCTGAAGGCGGAC | 144 |
| PGC1 α | NM_031347.1 | TGGAGTGACATAGAGTGTGCTG GCTGTCTGTGTCCAGGTCAT | 111 |
| ADBR3 | NM_013108.2 | TAGCAAGGAGCCTGACTTCTG TTCTGGAGAGTTGCGGTTCC | 133 |
| FAS | NM_017332.1 | TCGACTTCAAAGGACCCAGC TTAGCAGCAGGTTGATCCCG | 135 |
| LPL | NM_012598.2 | TGCCCTAAGGACCCCTGAAG ACATTCCTGTCACCGTCCATC | 140 |
| HPRT1 | NM_012583.2 | GCTTTCCTTGGTCAAGCAGT TCCAACAAAGTCTGGCCTGT | 103 |

Tabela 2. Descrição dos primers utilizados nas análises de PCR-RT.

4.14 Análise estatística

Os dados coletados foram organizados em planilhas do Excel[®] (2016) e em seguida exportados para o *software GraphPad Prism* versão 8.0.2 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA) para seguimento da análise estatística. Os resultados foram expressos como média \pm erro-padrão da média (EPM) e foram considerados significativos valores de $p < 0,05$.

A fim de verificar a normalidade de distribuição dos dados, foram realizados os testes de Kolgomorov-Smirnov ($n = < 7$) e de Shapiro-Wilk ($n \geq 7$) (RAZALI; WAH, 2011). Os resultados apresentaram distribuição normal e dessa forma, foram utilizados testes paramétricos. Na comparação entre dois grupos (controle/tumor) foi realizado teste *t* não-pareado bilateral e em comparações múltiplas intra-grupo (ao longo dos dias) e inter-grupos (controle/tumor) foi utilizado o teste *two-way* ANOVA, seguido de Sidak pós-teste, para identificação dos contrastes significantes.

5 RESULTADOS

5.1 Parâmetros de validação da caquexia

A partir da inoculação das células tumorais de hepatoma ascítico Yoshida AH-130, foi possível observar que o modelo de caquexia associado ao câncer foi bem estabelecido e caracterizado, como demonstrado na **Figura 15**. Ao final dos sete dias de experimento, houve redução estatisticamente significativa na massa corporal dos animais do grupo tumor ($-19,2 \pm 5,71$ g) em comparação aos animais controle ($10,3 \pm 1,89$ g) ($p < 0,001$) (**Figura 15A**). Pode-se também verificar o desenvolvimento das células tumorais e da síndrome de caquexia, por meio dos resultados de massa do tumor líquido ($56,7 \pm 6,44$ g) (**Figura 15B**), e da porcentagem de perda de massa corporal, expressa pelo índice de caquexia ($32,3 \pm 3,91$ %) (**Figura 15C**). Além disso, na **Figura 15D** está representado o gráfico de massa do músculo gastrocnêmio para os grupos avaliados. Nota-se que o grupo tumor ($0,88 \pm 0,02$ g) apresentou massa muscular de gastrocnêmio reduzida quando comparado ao grupo controle ($1,11 \pm 0,02$ g) ($p < 0,0001$).

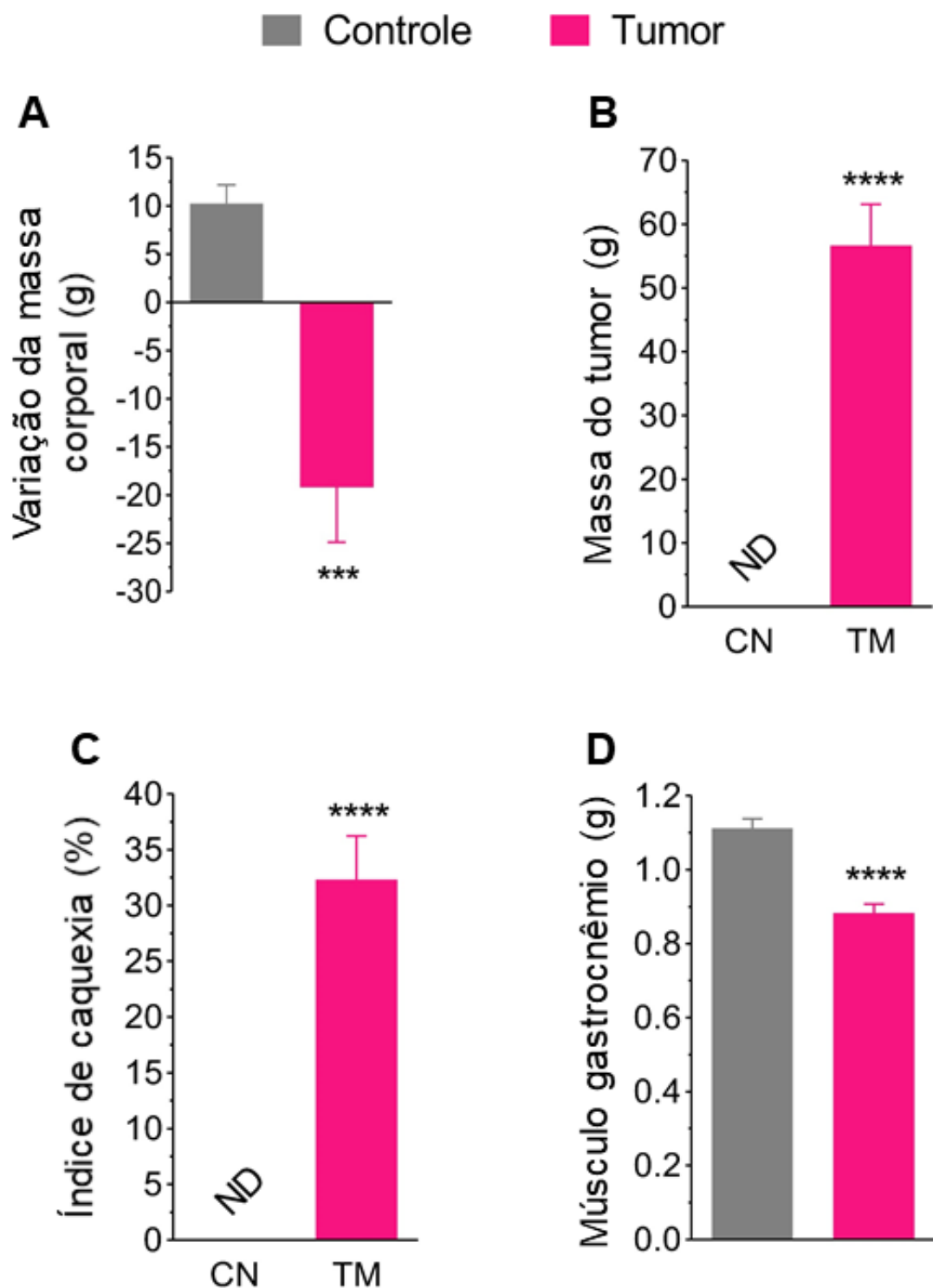


Figura 15. Caracterização da caquexia e avaliação de parâmetros relacionados. **(A)** Variação da massa corporal ao longo dos sete dias de experimento. **(B)** Massa do tumor líquido. **(C)** Índice de caquexia. **(D)** Massa relativa do músculo gastrocnêmio determinada por g de tecido/100g de massa corporal. Os dados estão representados como média \pm erro-padrão da média, $n = 8-9$ animais por grupo. *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$, teste t não-pareado bilateral. Legenda: ND = não detectado; CN = grupo controle; TM = grupo tumor.

5.2 Caquexia associada ao câncer reduz o consumo de ração

A **Figura 16A** e a **Figura 16B** apresentam o consumo de ração distribuído ao longo de cada dia de experimento para os grupos controle e tumor. Como destacado no gráfico da **Figura 16B**, o consumo de ração do grupo tumor começa a reduzir significativamente ($p < 0,05$) a partir do segundo dia após a inoculação das células, no entanto, é a partir do quarto dia de experimento que esta redução se torna mais expressiva, quando comparada ao grupo controle (**Figura 16A**: $p < 0,001$; **Figura 16B**: $p < 0,0001$). Na **Figura 16C** está expressa a média total do consumo diário de ração, na qual pode-se notar que o grupo tumor ($22,5 \pm 0,46$ g) apresentou uma redução estatisticamente significativa ($p < 0,05$) neste parâmetro em comparação ao grupo controle ($17,5 \pm 1,66$ g).

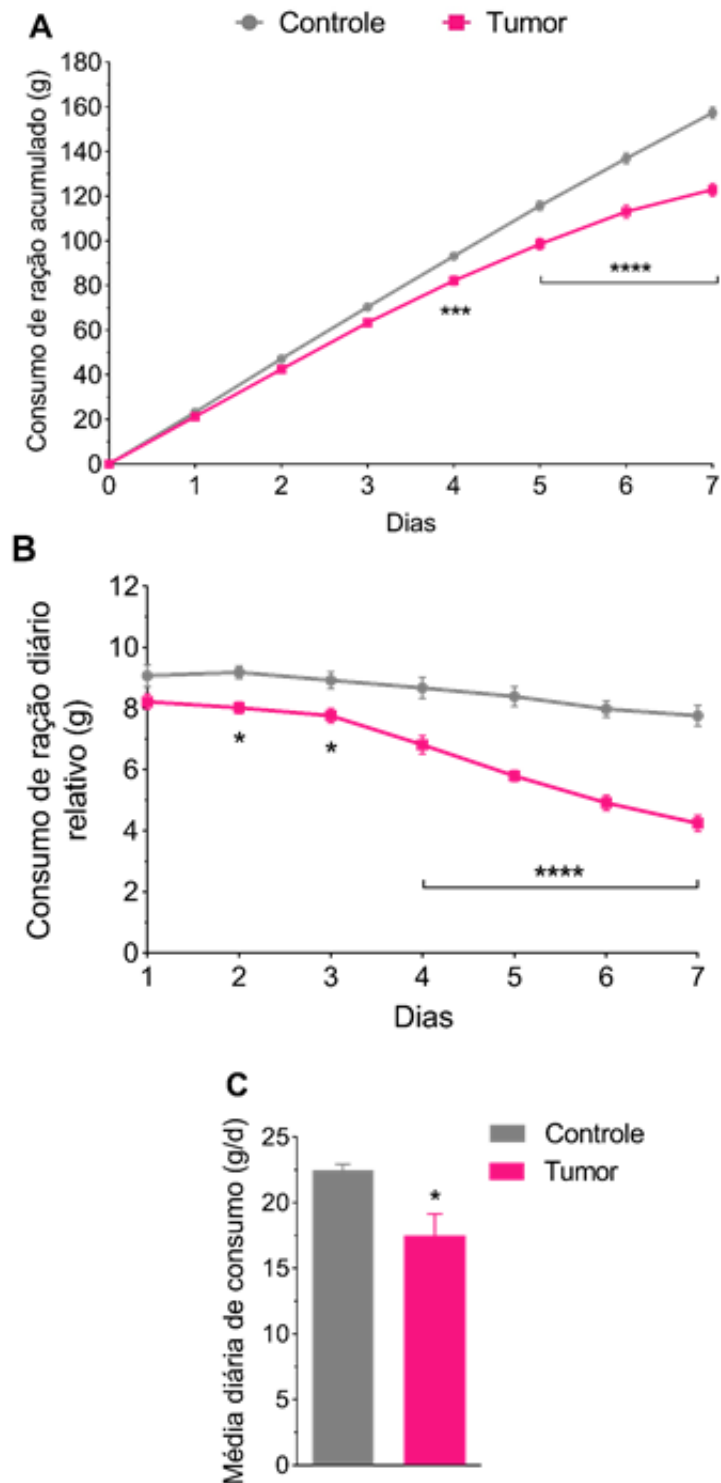


Figura 16. Efeito da caquexia associada ao câncer sobre o consumo de ração. **(A)** Consumo de ração acumulado. **(B)** Consumo de ração diário relativo determinado por g de ração consumida/100g de massa corporal **(C)** Média diária de consumo. Os dados estão representados como média \pm erro-padrão da média, $n = 8-9$ animais por grupo. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$, two-way ANOVA, seguido de Sidak pós-teste em (A-B), teste t não-pareado bilateral em (C).

5.3 Caquexia associada ao câncer reduz a eficiência metabólica

Corroborando os resultados de massa corporal e consumo de ração, foi possível observar, também, uma redução significativa na eficiência metabólica dos animais com tumor em relação aos animais controle ($-1,56 \pm 0,47$ g vs. $0,65 \pm 0,12$ g, respectivamente) ($p < 0,001$) (**Figura 17**). Isso significa que, considerando a mesma quantidade de ração consumida para os animais de ambos os grupos, a caquexia foi capaz de promover perda de massa corporal.

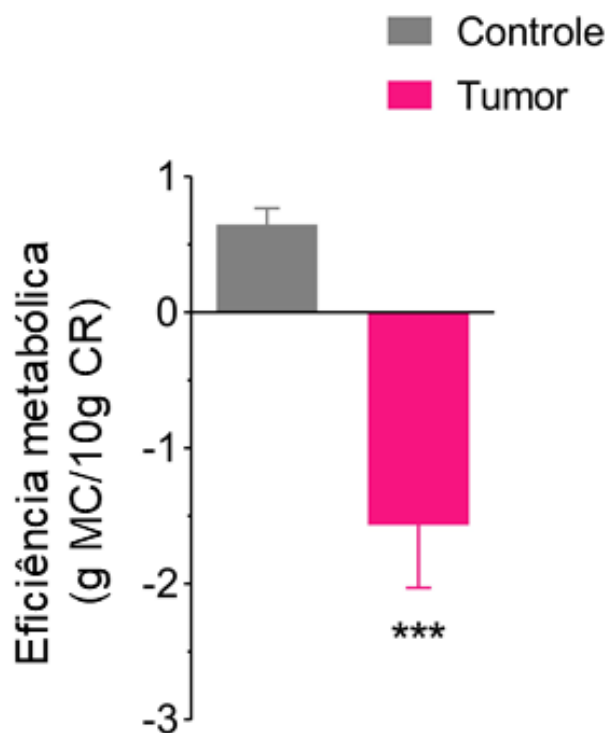
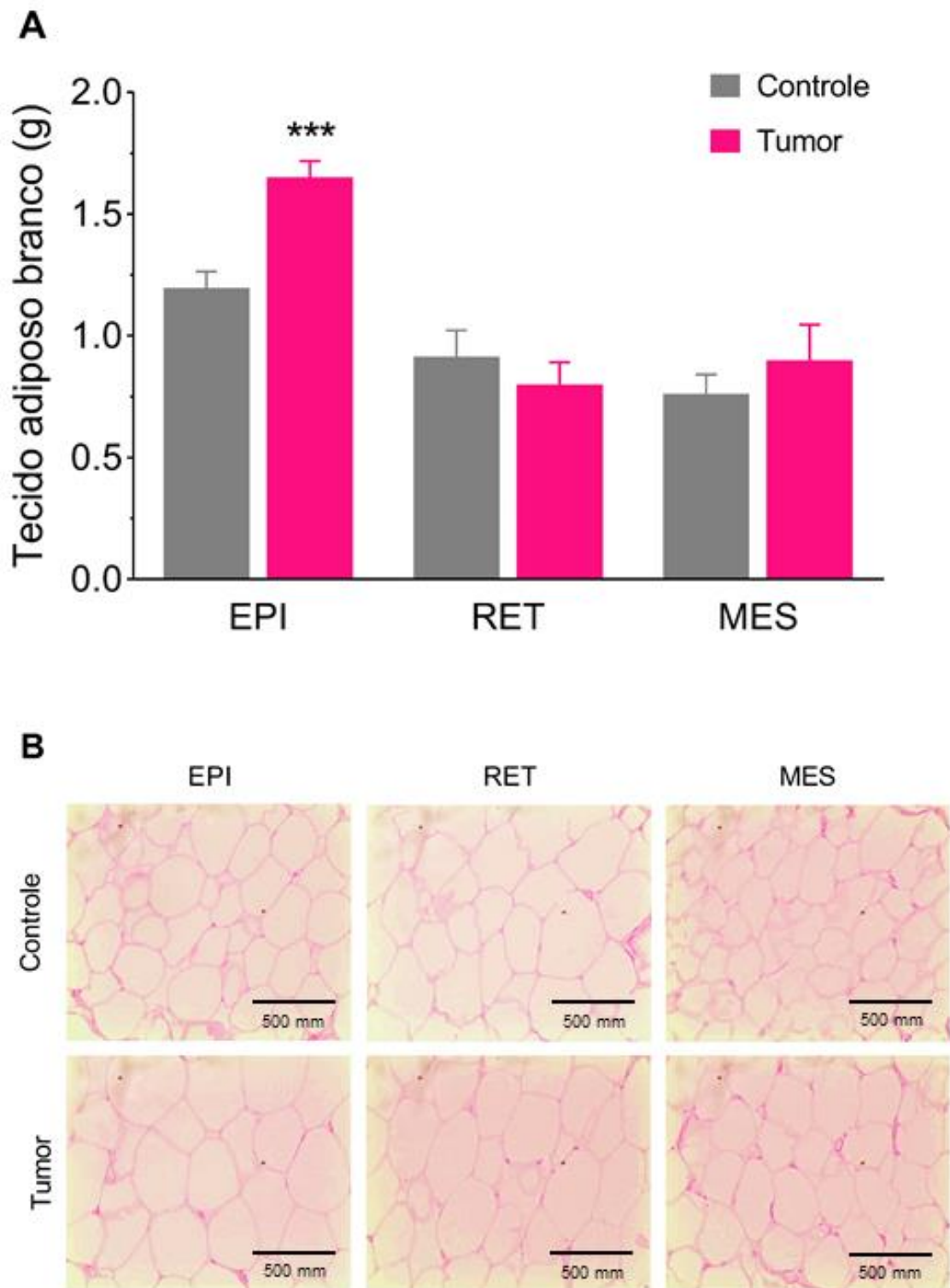


Figura 17. Efeito da caquexia associada ao câncer sobre o coeficiente de eficiência metabólica (EM). Os dados estão representados como média \pm erro-padrão da média, $n = 8-9$ animais por grupo. *** $p < 0,001$, teste t não-pareado bilateral. Legenda: MC = massa corporal; CR = consumo de ração.

5.4 Estudo do tecido adiposo branco na caquexia associada ao câncer

A caquexia associada ao câncer desencadeou alterações heterogêneas nos depósitos de tecido adiposo branco (TAB), como é mostrado na **Figura 18**. Destaca-se no gráfico de TAB epididimal (EPI), o aumento significativo ($p < 0,001$) desse depósito no grupo tumor ($1,65 \text{ g} \pm 0,007$) em comparação ao grupo controle ($1,24 \text{ g} \pm 0,006$). Entretanto, a massa dos compartimentos de TAB retroperitoneal (RET) e mesentérico (MES), neste estudo, não sofreu interferência da caquexia (RET: $0,93 \pm 0,12 \text{ g}$ vs. $0,80 \pm 0,09 \text{ g}$; MES: $0,72 \pm 0,08 \text{ g}$ vs. $0,90 \pm 0,14 \text{ g}$, para controle e tumor, respectivamente) (**Figura 18A**). Além disso, foi possível verificar adipócitos maiores no EPI dos animais caquéticos, enquanto nos demais depósitos, essa característica não foi encontrada (**Figura 18B**).



5.5 Análise de expressão gênica no tecido adiposo branco epididimal

Mediante os resultados significativos e expressivos obtidos para o depósito de tecido adiposo branco epididimal, decidiu-se, neste estudo, avaliar os efeitos da caquexia associada ao câncer sobre o padrão de genes termogênicos e lipogênicos neste compartimento.

Os resultados obtidos a partir das análises de expressão gênica apontam para a ausência de efeitos significativos da caquexia sobre o padrão de genes relacionados à processos termogênicos, aqui representados por: UCP1 ($p = 0,1291$); PGC1 α ($p = 0,7080$) e ADRB3 ($p = 0,5448$) (**Figura 19A-C**). Com relação aos genes envolvidos na lipogênese, foi observado que nos animais com tumor ocorreu aumento estatisticamente significativo na expressão de FAS e LPL ($p < 0,05$) (**Figura 19D-E**). Este desfecho corrobora os dados relativos à massa adiposa EPI, justificado pela ativação do processo de lipogênese.

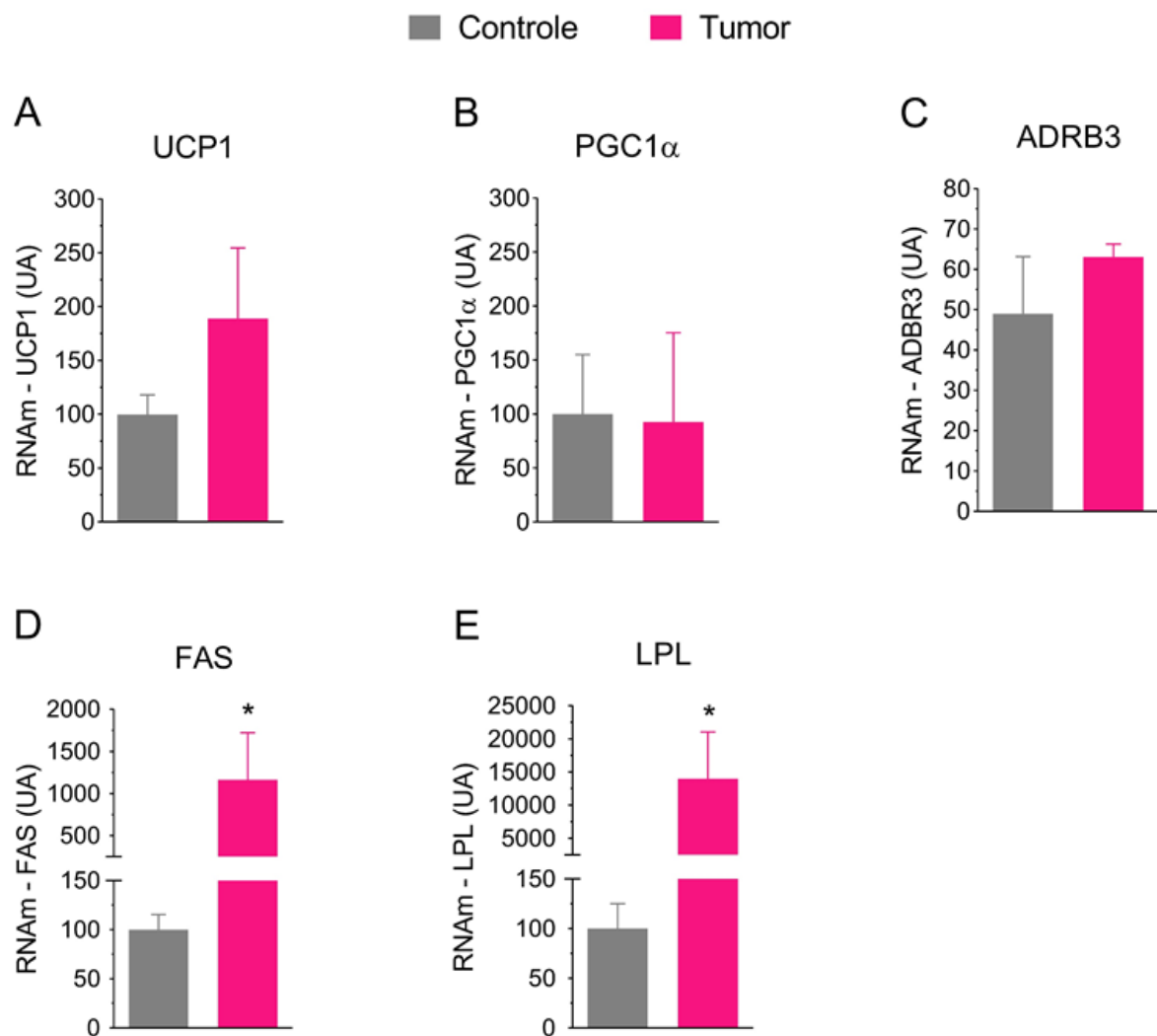


Figura 19. Expressão gênica de fatores termogênicos e lipogênicos no tecido adiposo branco epididimal. **(A)** Expressão gênica de UCP1. **(B)** Expressão gênica de PGC1 α . **(C)** Expressão gênica de ADRB3. **(D)** Expressão gênica de FAS. **(E)** Expressão gênica de LPL. Os dados estão representados como média \pm erro-padrão da média, n = 3-4 animais por grupo. * p < 0,05, teste t não-pareado bilateral. Legenda: UA = unidade arbitrária; UCP1 = proteína desacopladora 1; PGC1 α = coativador gama de receptor ativado por proliferador de peroxissoma 1 alfa; ADRB3 = receptor β 3-adrenérgico; FAS = ácido graxo sintase; LPL = lipase de lipoproteínas.

5.6 Estudo do tecido adiposo marrom na caquexia associada ao câncer

As médias de massa relativa do tecido adiposo marrom (TAM) para os grupos controle e tumor estão expostas na **Figura 20A**. Observou-se redução estatisticamente significativa ($p < 0,05$) na massa relativa do TAM nos animais portadores de tumor ($0,07 \pm 0,008$ g) quando comparados aos animais controle ($0,09 \pm 0,006$ g). Esse dado também é evidenciado por meio das imagens representativas da histologia do TAM apresentadas na **Figura 20B**.

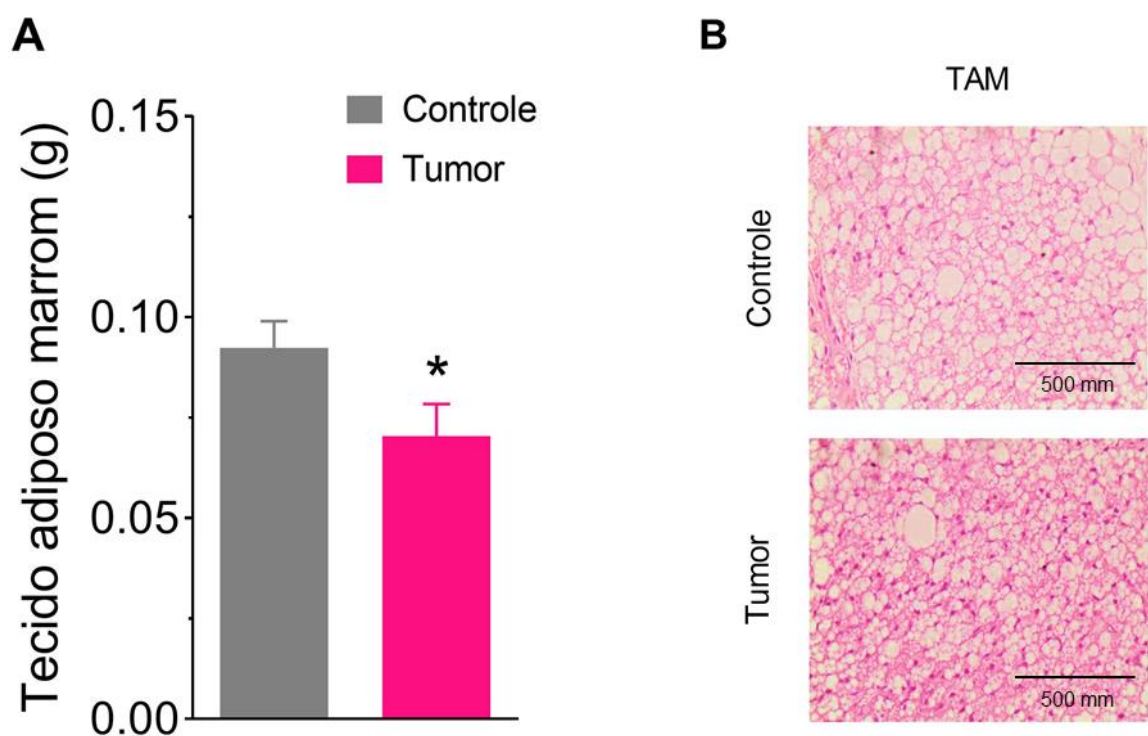


Figura 20. Massa e aspectos morfológicos do tecido adiposo marrom (TAM) na caquexia associada ao câncer. **(A)** Massa relativa do TAM determinada por g de tecido/100g de massa corporal. **(B)** Imagens representativas da histologia do TAM. Os dados estão representados como média \pm erro-padrão da média, $n = 8-9$ animais por grupo. * $p < 0,05$, teste t não-pareado bilateral em (A). Coloração com hematoxilina e eosina em (B), escala = 500 mm. Legenda: TAM = tecido adiposo marrom.

5.7 Avaliação da temperatura do tecido adiposo marrom na caquexia

Na **Figura 21** estão expressas as imagens representativas e a quantificação da temperatura interescapular do TAM para o tempo de 0, 4 e 7 dias de experimento. Observa-se, na **Figura 21A**, que ao final do protocolo (7 dias), a imagem termográfica representativa para o grupo tumor apresentou temperatura mais baixa quando comparada ao grupo controle ($p < 0,05$) (**Figura 21B**). Além disso, nota-se que nos demais dias avaliados, não houve diferença estatística na temperatura interescapular entre os grupos estudado (0 dias: $37,4 \pm 0,31$ °C vs. $37,4 \pm 0,20$ °C; 4 dias: $37,6 \pm 0,22$ °C vs. $37,6 \pm 0,14$ °C, para controle e tumor, respectivamente).

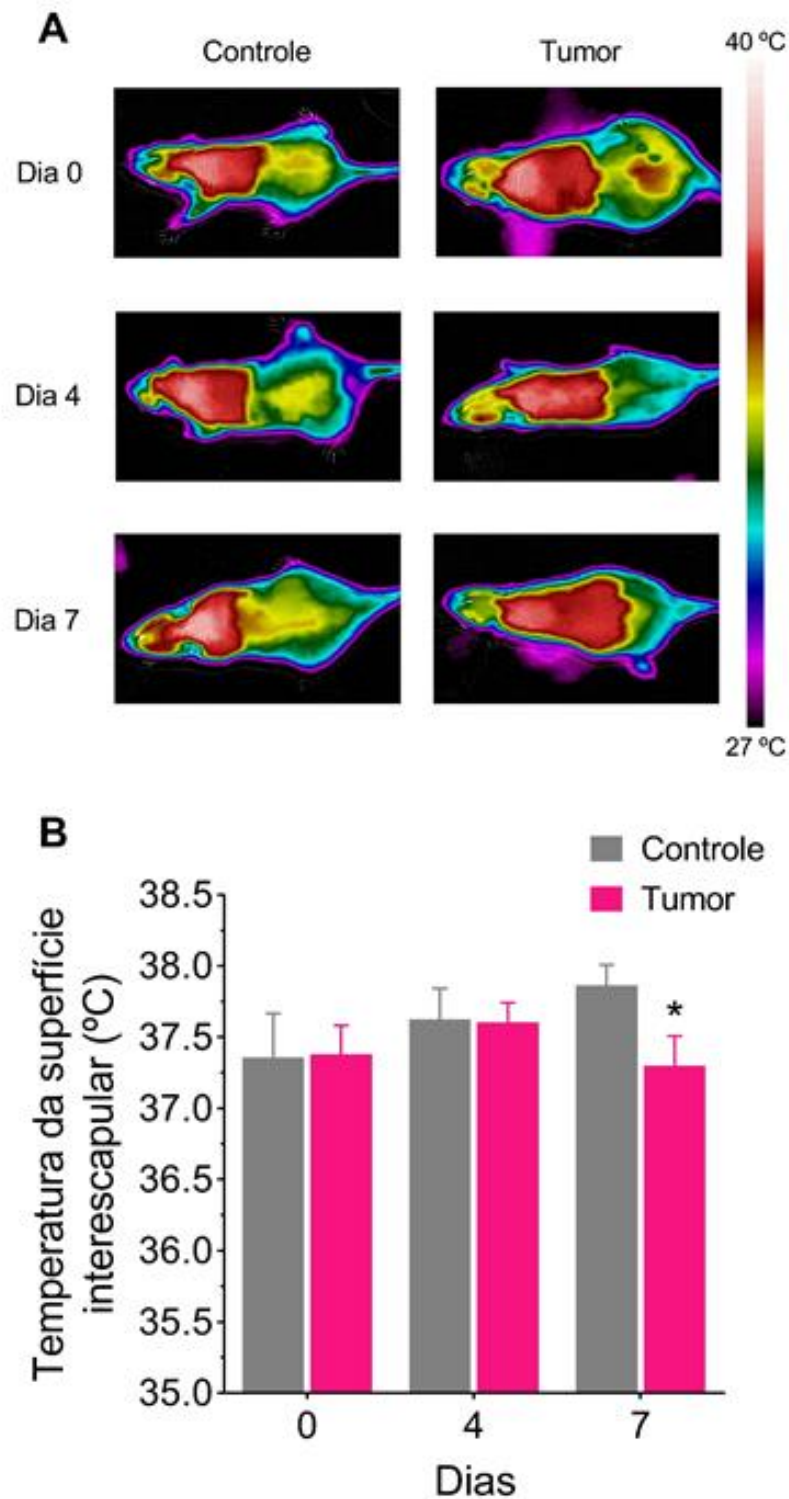


Figura 21. Efeito da caquexia associada ao câncer sobre a temperatura do tecido adiposo marrom (TAM). **(A)** Imagens termográficas representativas da temperatura interescapular do TAM e **(B)** quantificação da temperatura interescapular do TAM. Imagens termográficas capturadas nos dias 0, 4 e 7 de experimento em (A). Os dados estão representados como média \pm erro-padrão da média, $n = 7$ animais por grupo. * $p < 0,05$, teste t não-pareado bilateral em (B).

6. DISCUSSÃO

Pacientes com caquexia, comumente, apresentam redução de massa corporal, atrofia de músculo esquelético e perda progressiva de tecido adiposo branco (TAB) (ELATTAR; DIMRI; SATYANARAYANA, 2018; NORDHAUSEN et al., 2016). Entretanto, no contexto da caquexia associada ao câncer, o microambiente tumoral desempenha atividade de flexibilidade metabólica, de forma que as células se adaptam de acordo com os substratos disponíveis (TIRINATO et al., 2017; ROHRIG; SCHULZE, 2016). A partir daí, a lipogênese *de novo* de ácidos graxos torna-se um requisito chave para o metabolismo de alguns tipos de câncer, bem como, a utilização desses lipídios determina a agressividade do tumor (LENGYEL et al., 2018; LUENGO; GUI; VANDER HEIDEN, 2017).

Diante desse cenário atribuído à caquexia associada ao câncer, o propósito do presente trabalho consistiu em investigar, por meio de modelo experimental da síndrome, os impactos da caquexia em associação ao câncer sobre o balanço energético e o metabolismo do tecido adiposo.

Inicialmente, os resultados desta pesquisa demonstraram que o modelo de hepatoma ascítico Yoshida AH-130 foi capaz de reproduzir a caquexia. A perda de massa corporal > 5% e o índice de caquexia superior a 10% são características do desenvolvimento da síndrome de acordo com Voltarelli et al. (2017) e Martins et al. (2017), respectivamente. Além disso, Cassolla et al. (2011) consideraram a redução de massa muscular gastrocnêmica, um parâmetro para caracterização da caquexia e Camperi et al. (2017) qualificaram que esse modelo é bem caracterizado para a investigação da caquexia, por evidenciar perda progressiva de massa corpórea correspondente ao crescimento tumoral. Dessa forma, os achados do presente estudo demonstram que, de fato, os animais do grupo tumor tornaram-se caquéticos.

Resultados semelhantes foram observados em outros trabalhos utilizando o mesmo modelo de caquexia associada ao câncer (TROBEC et al., 2015; PHARM et al., 2014; SALAZAR-DEGRACIA et al., 2018; MASTROCOLA et al., 2008). Trobec et al. (2015) e Pharm et al (2014) realizaram protocolos de 10 e 14 dias, respectivamente, onde demonstraram redução no peso corporal final e na massa magra dos animais com tumor, em comparação aos valores basais. Salazar-Degracia et al. (2018) e Mastrocola et al. (2008), após sete dias da inoculação das células tumorais, verificaram menor peso corporal e massa muscular de gastrocnêmio nos animais com

caquexia quando comparados ao animais controle. Estudos empregando outro modelo de crescimento rápido do tumor – Walker 256 – também evidenciaram redução de massa corporal, avaliado pelo índice de caquexia (MARTINS et al., 2017; CASSOLLA et al., 2011; GUARNIER et al., 2010; FONSECA et al., 2009).

Na caquexia associada ao câncer, muitas vezes, o apetite é afetado, o que leva à anorexia e conseqüentemente à ingestão alimentar insuficiente (NASRAH et al., 2016; DWARKASING et al., 2014). A caquexia e a anorexia não são dependentes, ou seja, a manifestação de uma não está condicionada à outra, porém, a presença de anorexia agrava o quadro de caquexia, contribuindo para perda de peso (NORREN; DWARKASING; WITKAMP, 2017; MOLFINO et al., 2015). Redução no consumo de ração dos animais com caquexia associada ao modelo Yoshida AH-130 é observado em diversos estudos disponíveis na literatura (TOLEDO et al., 2016; MUSOLINO et al., 2016; OHBUCHI et al., 2015; ELKINA et al., 2013; SPRINGER et al., 2012; SCHMIDT et al., 2011).

Nossos achados evidenciaram diminuição acentuada no consumo de ração dos animais portadores de tumor. Embora não tenha sido investigado o padrão de resposta hipotalâmica, acredita-se que a anorexia secundária seja determinada pela incapacidade do hipotálamo em reagir adequadamente aos estímulos orexígenos e anorexígenos decorrentes de mudanças no balanço energético (DWARKASING et al., 2015; MUSCARITOLI et al., 2010; LAVIANO et al., 2008). Esse fenômeno pode ser desencadeado por mecanismos centrais ou periféricos. Dentre as causas periféricas, incluem-se função gastrointestinal desregulada, substâncias que interferem na ingestão alimentar, alterações nos nutrientes ou resposta inflamatória. As causas centrais podem ser depressão, dor ou alterações nos neurotransmissores (EZEIKE; MORLEY, 2015).

Nesse sentido, parece que a inflamação hipotalâmica desempenha papel central na anorexia (DALLMANN et al., 2011). As citocinas pró-inflamatórias oriundas do tumor estimulam repostas anorexígenas, enquanto inibem fatores orexígenos, por meio da regulação das vias de serotonina (NORREN; DWARKASING; WITKAMP, 2017). Porém, outras moléculas também participam dos mecanismos envolvidos na anorexia e caquexia associadas ao câncer, por exemplo, o fator inibidor de leucemia (LIF), induz a expressão de POMC, aumenta a liberação de α -MSH e participa da ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) (MRAVEC; HORVATHOVA; CERNACKOVA, 2018).

Juntamente com a perda de massa corporal e a diminuição do consumo de ração, foi constatado redução significativa na eficiência metabólica decorrente da caquexia. A título de comparação, se considerarmos a mesma quantidade de ração consumida para ambos os grupos, os animais caquéticos, ainda assim, perdem peso, por serem menos eficientes em armazenar energia. Isso representa um quadro metabólico desfavorável que contribui para o desenvolvimento e progressão da caquexia.

Os depósitos de tecido adiposo branco avaliados demonstraram respostas heterogêneas como resultado da caquexia. O tecido EPI apresentou maior adiposidade nos animais portadores de tumor, enquanto os tecidos retroperitoneal e mesentérico não foram afetados pela síndrome. Estudos desenvolvidos pelo grupo de pesquisa liderado pela Dr^a Marília Seelaender, utilizando o modelo de carcinossarcoma Walker 256, também revelaram repostas específicas para os diferentes depósitos de gordura visceral (BATISTA JÚNIOR et al., 2012; MACHADO; COSTA ROSA; SEELAENDER, 2004; BERTEVELLO; SEELAENDER, 2001).

O tecido adiposo apresenta um padrão de extrema heterogeneidade entre seus compartimentos anatômicos. Essa propriedade está relacionada a vários parâmetros, incluindo origem, capacidade proliferativa e adipogênica, metabolismo glicídico e lipídico, sensibilidade à insulina, controle hormonal, capacidade termogênica e vascularização (KWOK; LAM; XU, 2016). Adicionalmente, sabe-se que a resposta ao início e à progressão da caquexia tanto em humanos, como em animais, é bastante heterogênea (SEELAENDER; BATISTA JÚNIOR, 2014). Dessa forma, na vigência de caquexia, nota-se que as características específicas de cada depósito de tecido adiposo branco demonstram condições distintas de distribuição de gordura e mudanças nas propriedades morfofuncionais das células.

Apesar de grande parte da literatura constatar depleção de tecido adiposo branco, seja em modelos Yoshida AH-130 (TOLEDO et al., 2016; MUSOLINO et al., 2016; TROBEC et al., 2015; ELKINA et al., 2013; SPRINGER et al., 2012; SCHMIDT et al., 2011), ou em outros modelos de caquexia (PIN et al., 2019a; FRANCO et al., 2017; BONETTO et al., 2016; TSOLI et al., 2014), no presente estudo, verificamos incremento significativo na massa gorda do tecido adiposo EPI. Em busca de melhor compreender esse fenômeno, avaliamos a expressão gênica de alguns fatores ligados à termogênese e à lipogênese no referido depósito adiposo.

Em contrapartida aos fatores termogênicos, UCP1, PGC1 α e ADRB3, os quais não foram afetados pela caquexia, enzimas-chave nos processos de lipogênese e lipogênese *de novo*, LPL e FAS, tiveram sua expressão gênica aumentada no tecido adiposo branco EPI dos animais com caquexia associada ao câncer, ou seja, o aumento da massa do tecido é, de fato, decorrente da deposição de gordura. É possível que as alterações metabólicas derivadas da adaptação das células tumorais e do microambiente ao meio em que se encontram favoreça esse comportamento (KEENAN; CHI, 2015; ESCOTÉ; FAJAS, 2014).

A células tumorais são capazes de formar lipídios e a obtenção dos ácidos graxos ocorre principalmente por síntese *de novo*, ademais, o aumento da lipogênese é uma característica comum nos cânceres agressivos (LENGYEL et al., 2018; LUENGO; GUI; VANDER HEIDEN, 2017). Entretanto, o microambiente tumoral frequentemente sofre hipóxia, o que expõe as células a oscilações na disponibilidade de oxigênio, glicose e lipídios (MICHIELS; TELLIER; FERON, 2016; YASUI et al., 2010). Logo, as células cancerígenas são submetidas a reprogramações metabólicas para se adaptarem às vias energéticas alternativas (TIRINATO et al., 2017). Por exemplo, em condições de hipóxia moderada, a síntese de ácidos graxos encontra-se prejudicada, então as células tumorais dependem da captação dos lipídios da dieta e aumentam seu armazenamento para posterior suprimento de energia. Ou, nos quadros de hipóxia severa e baixo abastecimento de lipídios exógenos, as células cancerígenas dependem completamente da biossíntese *de novo* de ácidos graxos (ROHRIG; SCHULZE, 2016).

Em seguida, investigamos o comportamento do tecido adiposo marrom interescapular no contexto da caquexia. Foi demonstrado que os animais portadores de tumor apresentaram perda de massa adiposa marrom. Embora de forma modesta, a depleção de TAM, também é evidenciada por outros estudos conduzidos em ratos com caquexia associada ao câncer (TOLEDO et al., 2016; PHARM et al., 2014; VAN ROYEN et al., 2000). A redução de tecido marrom reflete a menor temperatura da superfície interscapular observada nesses animais ao final dos sete dias de experimento. Tomados juntos, tais resultados nos permitem considerar que a taxa de termogênese, especialmente no referido depósito, esteja limitada. Acredita-se que outros fatores sejam responsáveis pela perda de peso corporal dos animais caquéticos, como depleção de massa muscular e de massa magra em geral, alteração dos depósitos de tecido adiposo branco não avaliados neste estudo, e ativação de

termogênese decorrente do processo de *browning* dos adipócitos brancos (HAN et al., 2018; BRUGGEMAN et al., 2016).

A relação existente entre a microbiota intestinal e as alterações metabólicas envolvidas na caquexia pode ser um dos fatores envolvidos na depleção de tecido adiposo marrom. O estudo de Li et al. (2019), realizado com animais não caquéticos, demonstrou que o prejuízo da microbiota intestinal interferiu na capacidade termogênica do TAM, por reduzir a expressão de UCP1. No entanto, sabe-se que o *crosstalk* existente entre os microrganismos do trato gastrointestinal e o metabolismo energético participa da patogênese do câncer (ROY; TRINCHIERI, 2017; GARRETT, 2015). Além disso, foi observado disbiose microbiana e alteração da barreira intestinal em modelo de caquexia associada ao câncer em camundongos, independentemente de qualquer terapia (BINDELS et al., 2018). Mas, o estudo da microbiota na caquexia ainda é novo na literatura e maiores investigações são necessárias para melhor compreensão da ligação entre microbiota, termogênese e caquexia (ROY; TRINCHIERI, 2017; VARIAN et al., 2016).

Os achados deste trabalho apontam para a influência da caquexia associada ao câncer sobre a redução de massa corporal e consumo alimentar, bem como, sobre as respostas heterogêneas específicas para cada depósito de tecido adiposo, que parecem se relacionar com as implicações das células e do microambiente tumoral.

7. CONCLUSÃO

- O modelo de caquexia associada ao câncer desenvolvido pelas células tumorais Yoshida AH-130 foi bem estabelecido e caracterizado;
- A caquexia promoveu expressiva redução no consumo alimentar dos animais portadores de tumor;
- Nos animais caquéticos deste estudo, o tecido adiposo branco epididimal apresentou incremento da lipogênese, enquanto os depósitos retroperitoneal e mesentérico não foram alterados;
- Em decorrência da caquexia, houve depleção de tecido adiposo marrom e redução na temperatura desse tecido ao final do estudo.

REFERÊNCIAS

- ABDULLAHI, A.; JESCHKE, M. G. Taming the Flames: Targeting White Adipose Tissue Browning in Hypermetabolic Conditions. **Endocrine Reviews**, v. 38, 2017.
- ACKERMAN, D.; SIMON, M. C. Hypoxia, Lipids, and Cancer: Surviving the harsh Tumor Microenvironment. **Trends in Cell Biology**, v. 24, 2014.
- ALLEN, M.; JONES, J. L. Jekyll and Hyde: The Role of the Microenvironment on the Progression of Cancer. **Journal of Pathology**, v. 223, 2011.
- ALVES, M. J. **Caquexia Associada ao Câncer: A Contribuição da Via de Sinalização do TGF- β na Fibrose do Tecido Adiposo**. 2016. 124 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.
- ALVES, M. J. et al. Adipose Tissue Fibrosis in Human Cancer Cachexia: The Role of TGF- β Pathway. **BMC Cancer**, v. 17, 2017.
- AL-ZHOUGHBI, W. et al. Tumor Macroenvironment and Metabolism. **Seminars in Oncology**, v. 41, 2014.
- AMITANI, M. et al. Control of Food Intake and Muscle Wasting in Cachexia. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 45, 2013.
- AMOR, S. et al. Peritumoral Adipose Tissue as a Source of Inflammatory and Angiogenic Factors in Colorectal Cancer. **International Journal of Colorectal Disease**, v. 31, 2016.
- ANTUNES, M. M. et al. Adipose Tissue is Less Responsive to Food Restriction Anti-inflammatory Effects Than Liver, Muscle, and Brain in Mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 52, 2018.
- ARGILÉS, J. M. et al. Cancer Cachexia: Understanding the Molecular Basis. **Nature Reviews Cancer**, v. 14, 2014.
- ARGILÉS, J. M. et al. Inter-Tissue Communication in Cancer Cachexia. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 15, 2018.
- ARGILÉS, J. M. et al. Therapeutic Strategies Against Cancer Cachexia. **European Journal of Translational Myology**, v. 29, 2019.
- ARGILÉS, J. M.; BUSQUETS, S.; LÓPEZ-SORIANO, F. J. Cancer Cachexia, a Clinical Challenge. **Current Opinion in Oncology**, v. 1, 2019.
- ARNER, P.; LANGIN, D. Lipolysis in Lipid Turnover, Cancer Cachexia, and Obesity-Induced Insulin Resistance. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 25, 2014.

ARRUDA, A. P. et al. Hypothalamic Actions of Tumor Necrosis Factor Alpha Provide the Thermogenic Core for the Wastage Syndrome in Cachexia. **Endocrinology**, v. 151, 2010.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CUIDADOS PALIATIVOS. Consenso Brasileiro de Caquexia e Anorexia em Cuidados Paliativos. **Revista Brasileira de Cuidados Paliativos**, v.3, 2011.

BALKWILL, F. R.; CAPASSO, M.; HAGEMANN, T. The Tumor Microenvironment at a Glance. **Journal of Cell Science**, v. 125, 2012.

BALLARÒ, R.; COSTELLI, P.; PENNA, F. Animal Models for Cancer Cachexia. **Current Opinion in Supportive and Palliative Care**, v. 10, 2016.

BARACOS, V. E. et al. Cancer-Associated Cachexia. **Nature Reviews**, v. 4, 2018.

BATISTA JÚNIOR, M. L. et al. Adipose Tissue-Derived Factors as Potential Biomarkers in Cachectic Cancer Patients. **Cytokine**, v. 61, 2013.

BATISTA JÚNIOR, M. L. et al. Cachexia-Associated Adipose Tissue Morphological Rearrangement in Gastrointestinal Cancer Patients. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 7, 2016.

BATISTA JÚNIOR, M. L. et al. Heterogeneous Time-Dependent Response of Adipose Tissue During the Development of Cancer Cachexia. **Journal of Endocrinology**, v. 215, 2012.

BATISTA JÚNIOR, M. L.; HENRIQUES, F. Adipose Tissue Remodeling During Cancer Cachexia. In: **Metabolic Disorders**. IntechOpen, 2018.

BENNANI-BAITI, N.; WALSH, D. Animal Models of the Cancer Anorexia-Cachexia Syndrome. **Support Care Cancer**, v. 19, 2011.

BERTEVELLO, P. S.; SEELAENDER, M. C. L. Heterogeneous Response of Adipose Tissue to Cancer Cachexia. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 24, 2001.

BINDELS, L. B. et al. Increased Gut Permeability in Cancer Cachexia: Mechanisms and Clinical Relevance. **Oncotarget**, v. 9, 2018.

BONETTO, A. et al. The Colon-26 Carcinoma Tumor-Bearing Mouse as a Model for the Study of Cancer Cachexia. **Journal of Visualized Experiments**, v. 30, 2016.

BRUGGEMAN, A. R. et al. Cancer Cachexia: Beyond Weight Loss. **Journal of Oncology Practice**, v. 12, 2016.

CAMARGO, R. G. et al. NF- κ Bp65 and Expression of its Pro-Inflammatory Target Genes are Upregulated in the Subcutaneous Adipose Tissue of Cachectic Cancer Patients. **Nutrients**, v. 7, 2015.

- CAMILLERI, M. Peripheral Mechanisms in Appetite Regulation. **Gastroenterology**, v. 148, 2015.
- CAMPERI, A. et al. Vitamin D and VDR in Cancer Cachexia and Muscle Regeneration. **Oncotarget**, v. 8, 2017.
- CANNON, B.; NEDERGAARD, J. Brown Adipose Tissue: Function and Physiological Significance. **Physiological Reviews**, v. 84, 2004.
- CAO, D. X. et al. Role of β 1-Adrenoceptor in Increased Lipolysis in Cancer Cachexia. **Cancer Science**, v.101, 2010.
- CARNERO, A.; LLEONART, M. The Hypoxic Microenvironment: A Determinant of Cancer Stem Cell Evolution. **Bioessays**, v. 38, 2016.
- CARRACEDO, A; CANTLEY, L. C.; PANDOLFI, P. P. Cancer Metabolism: Fatty Acid Oxidation in the Limelight. **Nature Reviews Cancer**, v. 13, 2013.
- CASSOLLA, P. et al. Changes in Blood Metabolic Parameters During the Development of Walker-256 Tumour-Induced Cachexia in Rats are not Caused by Decreased Food Intake. **Cell Biochemistry and Function**, v. 30, 2011.
- CHEN, F. et al. New Horizons in Tumor Microenvironment Biology: Challenges and Opportunities. **BMC Medicine**, v. 13, 2015.
- CHEN, X. Y. et al. Reprogramming Induced by Isoliquiritigenin Diminishes Melanoma Cachexia through mTORC2-AKT-GSK3 β Signaling. **Oncotarget**, v. 8, 2017.
- CHEVALIER, S.; WINTER, A. Do Patients with Advanced Cancer Have any Potential for Protein Anabolism in Response to Amino Acid Therapy? **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 17, 2014.
- 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, 2011.
- CLAYTON, J. A. Studying Both Sexes: A Guiding Principle for Biomedicine. **The FASEB Journal**, v. 30, 2016.
- CONTRERAS, C. et al. Traveling from the Hypothalamus to the Adipose Tissue: The Thermogenic Pathway. **Redox Biology**, v. 12, 2017.
- COSPER, P. F.; LEINWAND, L. A. Cancer Causes Cardiac Atrophy and Autophagy in a Sexually Dimorphic Manner. **Cancer Research**, v. 71, 2011.
- DAAS, S. I.; RIZEQ, B. R.; NASRALLAH, G. K. Adipose tissue Dysfunction in Cancer Cachexia. **Journal of Cellular Physiology**, v. 234, 2018.
- DALAL, S. Lipid Metabolism in Cancer Cachexia. **Annals of Palliative Medicine**, v. 8, 2018.

- DALLMANN, R. et al. The Orally Active Melanocortin-4 Receptor Antagonist BL-6020/979: A Promising Candidate for the Treatment of Cancer Cachexia. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 2, 2011.
- DAMRAUER, J. S. et al. Chemotherapy-Induced Muscle Wasting: Association with NF- κ B and Cancer Cachexia. **European Journal of Translational Myology**, v. 28, 2018.
- DEBERARDINIS, R. J. et al. The Biology of Cancer: Metabolic Reprogramming Fuels Cell Growth and Proliferation. **Cell Metabolism**, v. 7, 2008.
- DEBOER, M. D. Animal Models of Anorexia and Cachexia. **Expert Opinion Drug Discovery**, v. 4, 2009.
- DEBOER, M. D.; MARKS, D. L. Cachexia: Lessons from Melanocortin Antagonism. **Trends Endocrinology Metabolism**, v. 17, 2006.
- DEWHIRST, M. W. An Integrated Multidisciplinary View of Tumor Metabolism. **The Cancer Journal**, v. 21, 2015.
- DIRAT, B. et al. Unraveling the Obesity and Breast Cancer Links: A Role for Cancer-Associated Adipocytes? **Endocrine Development**, v. 19, 2010.
- DONG, M. et al. Role of Brown Adipose Tissue in Metabolic Syndrome, Aging, and Cancer Cachexia. **Frontiers in Medicine**, v. 12, 2017.
- DONOHUE, C. L. et al. Emerging Concepts Linking Obesity with the Hallmarks of Cancer. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 28, 2017.
- DWARKASING, J. T. et al. Differences in Food Intake of Tumour-Bearing Cachectic Mice are Associated with Hypothalamic Serotonin Signaling. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 6, 2015.
- DWARKASING, J. T. et al. Hypothalamic Food Intake Regulation in a Cancer-Cachectic Mouse Model. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 5, 2014.
- EBADI, M.; MAZURAK, V. C. Evidence and Mechanisms of Fat Depletion in Cancer. **Nutrients**, v. 6, 2014.
- ELATTAR, S.; DIMRI, M.; SATYANARAYANA, A. The Tumor Secretory Factor ZAG Promotes White Adipose Tissue Browning and Energy Wasting. **The FASEB Journal**, v. 32, 2018.
- ELKINA, Y. et al. Tandospirone Reduces Wasting and Improves Cardiac Function in Experimental Cancer Cachexia. **International Journal of Cardiology**, v. 170, 2013.
- ESCOTÉ, X.; FAJAS, L. Metabolic Adaptation to Cancer Growth: From the Cell to the Organism. **Cancer Letters**, v. 356, 2014.

EZEOKE, C. C.; MORLEY, J. E. Pathophysiology of Anorexia in the Cancer Cachexia Syndrome. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 6, 2015.

FARKAS, J. et al. Cachexia as a Major Public Health Problem: Frequent, Costly, and Deadly. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 4, 2013.

FEARON, K. et al. Definition and Classification of Cancer Cachexia: An International Consensus. **The Lancet Oncology**, v. 12, 2011.

FEARON, K.; ARENDS, J.; BARACOS, V. Understanding the Mechanisms and Treatment Option in Cancer Cachexia. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 10, 2013.

FONSECA, E. A. I. et al. Study of Morphological Alterations of the Adrenal Glands in the Neoplastic Cachexia. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 30, 2009.

FONSECA-ALANIZ, M. H. et al. Adipose Tissue as an Endocrine Organ: From Theory to Practice. **Journal of Pediatrics**, v. 83, 2007.

FOULADIUN, M. et al. Body Composition and Time Course Changes in Regional Distribution of Fat and Lean Tissue in Unselected Cancer Patients on Palliative Care – Correlations with Food Intake, Metabolism, Exercise Capacity and Hormones. **Cancer**, v.103, 2005.

FRANCO, F. O. et al. Cancer Cachexia Differentially Regulates Visceral Adipose Tissue Turnover. **Journal of Endocrinology**, v. 232, 2017.

FREIRE, P. P. et al. The Pathway to Cancer Cachexia: MicroRNA-Regulated Networks in Muscle Wasting Based on Integrative Meta-Analysis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, 2019.

FRONTINI, A. et al. White-to-Brown Transdifferentiation of Omental Adipocytes in Patients Affected by Pheochromocytoma. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1831, 2013.

FU, Y. et al. The Reverse Warburg Effect is Likely to Be an Achilles' Heel of Cancer that Can Be Exploited for Cancer Therapy. **Oncotarget**, v. 8, 2017.

FUJITSUKA, N. et al. Potentiation of Ghrelin Signaling Attenuates Cancer Anorexia-Cachexia and Prolong Survival. **Translational Psychiatry**, v. 1, 2011.

GARCIA, J. M. et al. Active Ghrelin Levels and Active to Total Ghrelin Ratio in Cancer-Induced Cachexia. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 90, 2005.

GARG, A.; AGGARWAL, B. B. Nuclear Transcription Factor-kB as a Target for Cancer Drug Development. **Leukemia**, v. 16, 2002.

GARRET, W. S. Cancer and the Microbiota. **Science**, v. 348, 2015.

GOUIRAND, V. GUILLAUMOND, F.; VASSEUR, S. Influence of the Tumor Microenvironment on cancer Cells Metabolic Reprograming. **Frontiers in Oncology**, v. 8, 2018.

GRANDA-CAMERON, C.; LYNCH, M. P. Clinical Framework for Quality Improvement of Cancer Cachexia. **Asia-Pacific Journal of Oncology Nursing**, v. 5, 2018.

GUAITA-ESTERUELAS, S. et al. The Peritumoral Adipose Tissue Microenvironment and Cancer. The Roles of Fatty Acid Binding Protein 4 and Fatty Acid Binding Protein 5. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 462, 2018.

GUARNIER, F. A. et al. Time Course of Skeletal Muscle Loss and Oxidative Stress in Rats with Walker 256 Solid Tumor. **Muscle and Nerve**, v. 42, 2010.

GUILLEMOT-LEGRIS, O. et al. Obesity is Associated with Changes in Oxysterol Metabolism and Levels in Mice Liver, Hypothalamus, Adipose Tissue and Plasma. **Scientific Reports**, v. 6, 2016.

HALBERG, N.; WERNSTEDT, I.; SCHERER, P. E. The Adipocyte as an Endocrine Cell. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 37, 2008.

HALLE, J. L. et al. Tissue-Specific Dysregulation of Mitochondrial Respiratory Capacity and Coupling Control in Colon-26 Tumor-Induced Cachexia. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 1, 2019.

HAN, J. et al. Interleukin-6 Induces Fat Loss in Cancer Cachexia by Promoting White Adipose Tissue Lipolysis and Browning. **Lipids in Health and Disease**, v. 17, 2018.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, 2011.

HARMS, M.; SEALE, P. Brown and Beige Fat: Development, Function and Therapeutic Potential. **Nature Medicine**, v. 19, 2013.

HOLECEK, M. Muscle Wasting in Animal Models of Severe Illness. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 93, 2012.

HYLTANDER, A. et al. β -Adrenoceptor Activity and Resting Energy Metabolism in Weight Losing Cancer Patients. **European Journal of Cancer**, v. 36, 2000.

IOSSA, S. et al. Effect of High-Fat Feeding on Metabolic Efficiency and Mitochondrial Oxidative Capacity in Adult Rats. **British Journal of Nutrition**, v. 90, 2003.

ISHIDA, J. et al. Animal Models of Cachexia and Sarcopenia in Chronic Illness: Cardiac Function, Body Composition Changes and Therapeutic Results. **International Journal of Cardiology**, v. 238, 2017.

JASTROCH, M.; OELKRUG, R.; KEIPERT, S. Insights into Brown Adipose Tissue Evolution and Function from Non-Models Organisms. **Journal of Experimental Biology**, v. 221, 2018.

JEEJEEBHOY, K. N. Malnutrition, Fatigue, Frailty, Vulnerability, Sarcopenia and Cachexia: Overlap of Clinical Features. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, v. 15, 2012.

JUNTTILA, M. R.; SAUVAGE, F. J. Influence of Tumor Micro-Environment Heterogeneity on Therapeutic Response. **Nature**, v. 501, 2013.

KAJIMURA, S.; SAITO, M. A New era in Brown Adipose Tissue Biology: Molecular Control of Brown Fat Development and Energy Homeostasis. **Annual Review of Physiology**, v. 76, 2014.

KEENAN, M.; CHI, J. T. Alternative Fuels for Cancer Cells. **The Cancer Journal**, v. 21, 2015.

KEIPERT, S.; JASTROCH, M. Brite/Beige Fat and UCP1 – is it Thermogenesis? **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1837, 2014.

KIR, S. et al. Tumor-Derived PTHrP Triggers Adipose Tissue Browning and Cancer Cachexia. **Nature**, v. 513, 2014.

KIR, S.; SPIEGELMAN, M. Cachexia & Brown Fat: A Burning Issue in Cancer. **Trends in Cancer**, v. 2, 2016.

KLIEWER, K. L. et al. Adipose Tissue Lipolysis and Energy Metabolism in Early Cancer Cachexia in Mice. **Cancer Biology and Therapy**, v. 16, 2015.

KRASNOW, S. M.; MARKS, D. L. Neuropeptides in the Pathophysiology and Treatment of Cachexia. **Current Opinion in Supportive and Palliative Care**. v. 4, 2010.

KWOK, K. H. M.; LAM, K. S. L.; XU, A. Heterogeneity of White Adipose Tissue: Molecular Basis and Clinical Implications. **Experimental and Molecular Medicine**, v. 48, 2016.

LAVIANO A. et al Carnitine Administration Reduces Cytokine Levels, Improves Food Intake, and Ameliorates Body Composition in Tumor Bearing Rats. **Cancer Investigation**, v. 29, 2011.

LAVIANO, A. et al. NPY and Brain Monoamines in the Pathogenesis of Cancer Anorexia. **Nutrition**, v. 24, 2008.

LAVIANO, A. et al. Therapy Insight: Cancer Anorexia-Cachexia Syndrome-When All You Can Eat is Yourself. **Nature Clinical Practice Oncology**, v. 2, 2005.

LAVIANO, A.; GIRALDI, G. L.; KOVERECH, A. Does Nutrition Support Have a Role in Managing Cancer Cachexia? **Current Opinion in Supportive and Palliative Care**, v. 10, 2016.

LAVIANO, A.; MEGUID, M. M.; ROSSI-FANELLI, F. Cancer Anorexia: Clinical Implications, Pathogenesis, and Therapeutic Strategies. **The Lancet Oncology**, v. 4, 2003.

LEE, J. Y. et al. MCT4 as a Potential Therapeutic Target for Metastatic Gastric cancer with Peritoneal Carcinomatosis. **Oncotarget**, v. 7, 2016.

LENGYEL, E. et al. Cancer as a Matter of Fat: The Crosstalk Between Adipose Tissue and Tumors. **Trends in Cancer**, v. 4, 2018.

LI, B. et al. Microbiota Depletion Impairs Thermogenesis of Brown Adipose Tissue and Browning of White Adipose Tissue. **Cell Reports**, v. 26, 2019.

LIDFORS, L. et al. Enriched Cages for Groups of Laboratory Male Rats and Their Effects on Behavior, Weight Gain and Adrenal Glands. **Laboratory Animals**, v. 48, 2014.

LIRA, F. S.; ROSA NETO J. C.; SEELAENDER, M. Exercise Training as Treatment in Cancer Cachexia. **Applied Physiology Nutrition and Metabolism**, v. 39, 2014.

LOUMAYE, A.; THISSEN, J. P. Biomarkers of Cancer Cachexia. **Clinical Biochemistry**, v. 50, 2017.

LOUREIRO, M. M. et al. Impacto do exercício físico regular no catabolismo muscular subjacente à caquexia associada ao cancro. **Revista Portuguesa de Ciências do Desporto**, v. 14, 2014.

LUCIA, S. et al. Cancer Cachexia: From Molecular Mechanisms to Patient's Care. **Critical Reviews in Oncogenesis**, v. 17, 2012.

LUENGO, A.; GUI, D. Y.; VANDER HEIDEN, M. G. Targeting Metabolism for Cancer Therapy. **Cell Chemical Biology**, v. 24, 2017.

MACHADO, A. P.; COSTA ROSA L. F. P. B.; SEELAENDER, M. C. L. Adipose Tissue in Walker 256 Tumor-Induced Cachexia: Possible Association Between Decreased Leptin Concentration and Mononuclear Infiltration. **Cell and Tissue Research**, v. 318, 2004.

MARIMAN, E. C. M.; WANG, P. Adipocyte Extracellular Matrix Composition, Dynamics and Role in Obesity. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 66, 2010.

MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, N. et al. Hypothalamic AMPK-ER Stress-JNK1 Axis Mediates the Central Actions of Thyroid Hormones on Energy Balance. **Cell Metabolism**, v. 6, 2017.

- MARTINS, H. A. et al. L-Glutamine Supplementation promotes an Improved Energetic Balance in Walker-256 Tumor-Bearing Rats. **Tumor Biology**, v. 39, 2017.
- MASTROCOLA, R. et al. Muscle Wasting in Diabetic and in Tumor-Bearing Rats: Role of Oxidative Stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 44, 2008.
- MATOS-NETO, E. M. et al. Systemic Inflammation in Cachexia - Is Tumor Cytokine Expression Profile the Culprit? **Frontiers in Immunology**, v 6, 2015.
- MATSUYAMA, T. et al. Tumor Inoculation Site Affects the Development of Cancer Cachexia and Muscle Wasting. **International Journal of Cancer**, v. 137, 2015.
- MATTOX, T. W. Cancer Cachexia: Cause, Diagnosis, and Treatment. **Nutrition in Clinical Practice**, v. 32, 2017.
- MICHAELIS, K. A. et al. Establishment and Characterization of a Novel Murine Model of Pancreatic Cancer Cachexia. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 8, 2017.
- MICHIELS, C.; TELLIER, C.; FERON, O. Cycling Hypoxia: A Key Feature of the Tumor Microenvironment. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1866, 2016.
- MIGNECO, G. et al. Glycolytic Cancer Associated Fibroblasts Promote Breast Cancer Tumor Growth, without a Measurable Increase in Angiogenesis: Evidence for Stromal-Epithelial Metabolic Coupling. **Cell Cycle**, v. 9, 2010.
- MOLFINO, A. et al. Contribution of Neuroinflammation to the Pathogenesis of Cancer Cachexia. **Mediators of Inflammation**, v. 1, 2015.
- MRAVEC, B.; HORVATHOVA, L.; CERNACKOVA, A. Hypothalamic Inflammation at a Crossroad of Somatic Diseases. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 39, 2018.
- MUPPALA, J. N. K. et al. Microenvironment-A Role in Tumour Progression and Prognosis. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 7, 2013.
- MURPHY, R. A. et al. Loss of Adipose Tissue and Plasma Phospholipids: Relationship to Survival in Advanced Cancer Patients. **Clinical Nutrition**, v. 29, 2010.
- MUSCARITOLI, M. et al. Consensus Definition of Sarcopenia, Cachexia and Pre-Cachexia: Joint Document Elaborated by Special Interest Groups (SIG) "Cachexia-Anorexia in Chronic Wasting Diseases" and "Nutrition in Geriatrics", **Clinical Nutrition**, v. 29, 2010.
- MUSOLINO, V. et al. Megestrol Acetate Improves Cardiac Function in a Model of Cancer Cachexia-Induced Cardiomyopathy by Autophagic Modulation. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 7, 2016.

NASRAH, R. et al. Defining the Role of Dietary Intake in Determining Weight Changes in Patients with Cancer Cachexia. **Clinical Nutrition**, v. 37, 2016.

NEDERGAARD, J.; BENGTSSON, T.; CANNON, B. Unexpected Evidence for Active Brown Adipose Tissue in Adult Humans. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 293, 2007.

NEVES, R. X. et al. White Adipose Tissue Cells and the Progression of Cachexia: Inflammatory Pathways. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 7, 2016.

NICOLINI, A. et al. Malnutrition, Anorexia and Cachexia in Cancer Patients: A Mini-Review on Pathogenesis and Treatment, **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 67, 2013.

NIEMAN, K. M. et al. Adipose Tissue and Adipocytes Supports Tumorigenesis and Metastasis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1831, 2013.

NORDHAUSEN, K. et al. Cachexia-Anorexia Syndrome in Patients with Peritoneal Metastasis: An Observational Study. **Pleura and Peritoneum**, v. 1, 2016.

NORREN, K. et al. Behavioral Changes are a Major Contributing Factor in the Reduction of Sarcopenia in Caloric-Restricted Ageing Mice. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 6, 2015.

NORREN, K.; DWARKASING, J. T.; WITKAMP, R. F. The Role of Hypothalamic Inflammation, the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis and Serotonin in the Cancer Anorexia-Cachexia Syndrome. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 20, 2017.

OELKRUG, R.; POLYMEROPOULOS, E. T.; JASTROCH, M. Brown Adipose Tissue: Physiological Function and Evolutionary Significance. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 185, 2015.

OHBUCHI, K. et al. Rikkunshito Ameliorates Cancer Cachexia Partly through Elevation of Glucarate in Plasma. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 1, 2015.

OUCHI, N. et al. Adipokines in Inflammation and Metabolic Disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, 2011.

OZORIO, G. A.; BARÃO, K.; FORONES, N. M. Cachexia Stage, Patient-Generated Subjective Global Assessment, Phase Angle, and Handgrip Strength in Patients with Gastrointestinal Cancer. **Nutrition and Cancer**, v. 69, 2017.

PALUS, S. et al. Simvastatin Reduces Wasting and Improves Cardiac Function as Well as Outcome in Experimental Cancer Cachexia. **International Journal of Cardiology**, v. 168, 2013.

PATEL, H. J.; PATEL, B. M. TNF- α and Cancer Cachexia: Molecular Insights and Clinical Implications. **Life Sciences**, v. 170, 2017.

PAVLIDES, S. et al. Loss of Stromal Caveolin-1 Leads to Oxidative Stress, Mimic Hypoxia and Drives Inflammation in the Tumor Microenvironment, Conferring the “Reverse Warburg Effect”: A Transcriptional Informatics Analysis with Validation. **Cell Cycle**, v. 9, 2010.

PEINADO, J. R. et al. The Stromal-Vascular Fraction of Adipose Tissue Contributes to Major Differences Between Subcutaneous and Visceral Fat Depots. **Proteomics**, v. 10, 2010.

PENET, M. F. et al. Understanding Cancer-Induced Cachexia: Imaging the Flame and its Fuel. **Current Opinion in Supportive and Palliative Care**, v. 5, 2011.

PENET, M. F.; BHUJWALLA, Z. M. Cancer Cachexia, Recent Advances, and Future Directions. **The Cancer Journal**, v. 21, 2015.

PENNA, F.; BUSQUETS, S.; ARGILÉS, J. M. Experimental Cancer Cachexia: Evolving Strategies for Getting Closer to the Human Scenario. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 54, 2016.

PETERSON, S. J.; MOZER, M. Differentiating Sarcopenia and Cachexia Among Patients with Cancer. **Nutrition in Clinical Practice**, v. 32, 2017.

PETRUZZELLI, M. et al. A Switch from White to Brown Fat Increases Energy Expenditure in Cancer-Associated Cachexia. **Cell Metabolism**, v. 20, 2014.

PETRUZZELLI, M.; WAGNER, E. F. Mechanisms of Metabolic Dysfunction in Cancer-Associated Cachexia. **Genes and Development**, v. 30, 2016.

PHARM, K. T. M. et al. Rosiglitazone Reduces Body Wasting and Improves Survival in a Rat Model of Cancer Cachexia. **Nutrition**, v. 20, 2014.

PIN, F. et al. Cachexia Induced by Cancer and Chemotherapy Yield Distinct Perturbations to Energy Metabolism. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 10, 2019a.

PIN, F. et al. PDK4 Drives Metabolic Alteration and Muscle Atrophy in cancer Cachexia. **The FASEB Journal**, v. 33, 2019b.

PINTO NETO, N. I. et al. Peritumoral Adipose Tissue Pro-Inflammatory Cytokines are Associated with Tumoural Growth Factors in Cancer Cachexia Patients. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 9, 2018.

POLACOW, V. O.; LANCHÁ JÚNIOR, A. H. Dietas Hiperglicídicas: Efeitos da Substituição Isoenergética de Gordura por Carboidratos sobre o Metabolismo de Lipídios, Adiposidade Corporal e sua Associação com Atividade Física e com o Risco de Doença Cardiovascular. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 51, 2007.

PORPORATO, P. E. Understanding Cachexia as a Cancer Metabolism Syndrome. **Oncogenesis**, v. 5, 2016.

PRINZ, P.; STENGEL, A. Control of Food Intake by Gastrointestinal Peptides: Mechanisms of Action and Possible Modulation in the Treatment of Obesity. **Journal of Neurogastroenterology and Motility** v. 23, 2017.

RASOAMANANA, R. et al. Nutrient Sensing and Signalling by the Gut. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 71, 2012.

RAZALI, N. M.; WAH, Y. B. Power Comparisons of Shapiro-Wilk, Kolmogoroc-Smirnov, Lilliefors and Anderson-Darling Tests. **Journal of Statistical Modeling and Analytics**, v. 2, 2011

ROHM, M. et al. Energy Metabolism in Cachexia. **EMBO Reports**, v. 20, 2019.

ROHRIG, F.; SCHULZE, A. The Multifaceted Roles of Fatty Acid Synthesis in Cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 16, 2016.

ROHWER, N.; CRAMER, T. Hypoxia-Mediated Drug Resistance: Novel Insights on the Functional Interaction of HIFs and Cell Death Pathway. **Drug Resistance Updates**, v. 14, 2011.

ROY, S.; TRINCHIERI, G. Microbiota: A Key Orchestrator of Cancer Therapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 17, 2017.

SALAZAR-DEGRACIA, A. et al. Effects of the Beta₂ Agonist Formoterol on Atrophy Signaling, Autophagy, and Muscle Phenotype in Respiratory and Limb Muscles of Rats with Cancer-Induced Cachexia. **Biochimie**, v. 149, 2018.

SANCHEZ-GURMACHES, J.; GUERTIN, D. A. Adipocyte Lineages: Tracing Back the Origins of Fat. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1842, 2014.

SANCHEZ-GURMACHES, J.; HUNG, C. M.; GUERTIN, D. A. Emerging Complexities in Adipocyte Origins and Identity. **Trends in Cell Biology**, v. 26, 2016.

SCARLETT, J. M. et al. Regulation of Central Melanocortin Signaling by Interleukin-1 β . **Endocrinology**, v.148, 2007.

SCHMIDT, K. et al. IGF-1 Treatment Reduces Weight Loss and Improves Outcome in a Rat Model of Cancer Cachexia. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 2, 2011.

SCHOETTL, T.; FISCHER, I. P.; USSAR, S. Heterogeneity of Adipose Tissue in Development and Metabolic Function. **Journal of experimental Biology**, v. 221, 2018.

SEELAENDER, M. C. L.; BATISTA JÚNIOR, M. L. Adipose Tissue Inflammation and Cancer Cachexia: The Role of Steroid Hormones. **Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation**, v. 17, 2014.

SEELAENDER, M. et al. Inflammation in Cachexia. **Mediators of Inflammation**, v. 1, 2015.

SEELAENDER, M. et al. Inflammation in Cancer Cachexia: To Resolve or not to Resolve (Is that the Question?). **Clinical Nutrition**, v 31, 2012.

SHARP, J. L. et al. Stress-Like Responses to Common Procedures in Male Rats Housed Alone or With Other Rats. **Contemporary Topics in Laboratory Animal Science**, v. 41, 2002.

SIDOSSIS, L.; KAJIMURA, S. Brown and Beige Fat in Humans: Thermogenic Adipocytes that Control Energy and Glucose Homeostasis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 125, 2015.

SILVA, F. F. et al. Pioglitazone Improves Insulin Sensitivity and Reduces Weight Loss in Walker-256 Tumor-Bearing Rats. **Life Sciences**, v. 171, 2017.

SILVÉRIO, R. et al. Lipases and Lipid Droplet-Associated Protein Expression in Subcutaneous White Adipose Tissue of Cachectic Patients with Cancer. **Lipids in Health and Disease**, v. 16, 2017

SIMON, M. C. The Hypoxia Response Pathways – Hats Off! **New England Journal of Medicine**, v. 375, 2016.

SOTGIA, F. et al. Mitochondrial Metabolism in Cancer Metastasis. **Cell Cycle**, v. 11, 2012.

SPRINGER, J. et al. Inhibition of Xanthine Oxidase Reduces Wasting and Improves Outcome in a Rat Model of Cancer Cachexia. **International Journal of Cancer**, v. 131, 2012.

STOFKOVA, A. et al. Effect of Feeding Status on Adjuvant Arthritis Severity, Cachexia, and Insulin Sensitivity in Male Lewis Rats. **Mediators of Inflammation**, v. 2010.

SUCHACKI, K. J. et al. Skeletal Energy Homeostasis: A Paradigm of Endocrine Discovery. **Journal of Endocrinology**, v. 234, 2017.

SUGANAMI, T.; TANAKA, M.; OGAWA, Y. Adipose Tissue Inflammation and Ectopic Lipid Accumulation. **Endocrine Journal**, v. 59, 2012.

SUN, B. et al. The Study on Mechanism of the Modified Chinese Herbal Compound, Jianpijiedu, on a Mouse Model of Hepatic Carcinoma Cachexia. **Molecular Medicine Reports**, v. 14, 2016.

SUZUKI, K.; JAYASENA, C. N.; BLOOM, S. R. Obesity and Appetite Control. **Experimental Diabetes Research**, v. 1, 2012.

TAO, L. et al. Cancer Associated Fibroblasts: An Essential Role in the Tumor Microenvironment (Review). **Oncology Letters**, v. 14, 2017.

TIRINATO, L. et al. An Overview of Lipid Droplets in Cancer and Cancer Stem Cells. **Stem Cells International**, v. 1, 2017.

TOLEDO, M. et al. A Multifactorial Anti-Cachectic Approach for Cancer Cachexia in a Rat Model Undergoing Chemotherapy. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 7, 2016.

TORRES-LEAL, F. L. et al. The Role of Inflamed Adipose Tissue in The Insulin Resistance. **Cell Biochemistry and Function**, v. 28, 2010.

TRAYHURN, P.; WOOD, I. S. Adipokines: Inflammation and the Pleiotropic Role of White Adipose Tissue. **British Journal of Nutrition**, v. 92, 2004.

TROBEC, K. C. et al. Influence of Cancer Cachexia on Drug Liver Metabolism and Renal Elimination in Rats. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 6, 2015.

TSCHIRNER, A. et al. Ursodeoxycholic Acid Treatment in a Rat Model of Cancer Cachexia. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 3, 2012.

TSOLI, M. et al. Activation of Thermogenesis in Brown Adipose Tissue and Dysregulated Lipid Metabolism Associated with Cancer Cachexia in Mice. **Cancer Research**, v. 72, 2012.

TSOLI, M. et al. Depletion of White Adipose Tissue in Cancer Cachexia Syndrome is Associated with Inflammatory Signaling and Disrupted Circadian Regulation. **PLoS One**, v. 9, 2014.

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, 2016.

UNGEFROREN, H. et al. Interaction of Tumor Cells with the Microenvironment. **Cell Communication and Signaling**, v. 9, 2011.

VAITKUS, J. A.; CELI, F. S. The Role of Adipose Tissue in Cancer-Associated Cachexia. **Experimental Biology and Medicine**, v. 242, 2017.

VALKENBURG, K.; GROOT, A. E.; PIENTA, K. J. Targeting the Tumour Stroma to Improve Cancer Therapy. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 15, 2018.

VAN ROYEN, M. et al. DNA Fragmentation Occurs in Skeletal Muscle During Tumor Growth: A Link with Cancer Cachexia? **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 270, 2000.

VARIAN, B. J. et al. Beneficial Bacteria Inhibit Cachexia. **Oncotarget**, v. 7, 2016.

VAZEILLE, C; et al. Relation Between Hypermetabolism, Cachexia, and Survival in Cancer Patients: A Prospective Study in 390 Cancer Patients Before Initiation of Anticancer Therapy. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 105, 2017.

VICENTE, R. et al. The Systemic Inflammatory Response is Involved in the Regulation of K⁺ Channel Expression in Brain via TNF- α -Dependent and -Independent Pathways. **FEBS Letters**, v. 572, 2004.

VOLTARELLI, F. A. et al. Syngeneic B16F10 Melanoma Causes Cachexia and Impaired Skeletal Muscle Strength and Locomotor Activity in Mice. **Frontiers in Physiology**, v. 8, 2017.

WAGNER, M. et al. Inflamed Tumor-Associated Adipose Tissue is a Depot for Macrophages that Stimulate Tumor Growth and Angiogenesis. **Angiogenesis**, v. 15, 2012.

WANG, F. et al. The Warburg Effect in Human Pancreatic Cancer Cells Triggers Cachexia in Athymic Mice Carrying the Cancer Cells. **BMC Cancer**, v. 18, 2018.

WANG, J. et al. New Prospect for Cancer Cachexia: Medical Cannabinoid. **Journal of Cancer**, v. 10, 2019.

WANG, M. et al. Role of Tumor Microenvironment in Tumorigenesis. **Journal of Cancer**, v. 8, 2017.

WILDE, L. et al. Metabolic Coupling and the Reverse Warburg Effect in Cancer, Implications for Novel Biomarker and Anticancer Agent Development. **Seminars in Oncology**, v. 44, 2017.

WU, J.; COHEN, P.; SPIEGELMAN, M. Adaptative Thermogenesis in Adipocytes: Is Beige the New Brown? **Genes and Development**, v. 27, 2013.

YAMASHITA, A. S. et al. White Adipose Tissue IFN- γ Expression and Signalling along the Progression of Rodent Cancer Cachexia. **Cytokine**, v. 89, 2017.

YASUI, H. et al. Low Field Magnetic Resonance Imaging to Visualize Chronic and Cycling Hypoxia in Tumor-Bearing Mice. **Cancer Research**, v. 70, 2010.

YOSHIDA, G. J. Metabolic Reprogramming: The Emerging Concept and Associated Therapeutic Strategies. **Journal of Experimental and Clinical Research**, v. 34, 2015.

YOSHIDA, T. Contributions of the Ascites Hepatoma to the Concept of Malignancy of Cancer. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 63, 1956.

YOSHIMURA, M. et al. Z-505 Hydrochloride, an Orally Active Ghrelin Agonist, Attenuates the Progression of Cancer Cachexia via Anabolic Hormones in Colon 26 Tumor-Bearing Mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 15, 2017.

ZAAL, E. A.; BERKERS, C. R. The Influence of Metabolism on Drug Response in Cancer. **Frontiers in Oncology**, v. 8, 2018.

ZHENG, Y. et al. Pay Attention to Cardiac Remodeling in Cancer Cachexia. **Support Care Cancer**, v. 24, 2016.

ZHOU, T. et al. Development and Validation of a Clinically Applicable Score to Classify Cachexia Stages in Advanced Cancer Patients. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 9, 2018.



ZOICO, E. et al. Morphological and Functional Changes in the Peritumoral Adipose Tissue of Colorectal Cancer Patients. **Obesity (Silver Spring, Md)**, v. 1, 2017.

ANEXOS


ANEXO A – Aprovação do comitê de ética animal

ANEXO B – Artigo enviado para publicação

ANEXO A – Aprovação do comitê de ética animal

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|---|---|------------|------------------------------------|-------------------------|---------------------------|-----------------------|---------------------------|---------------|-----|-------------|---------------------|------|--------|--------|---------------------------|
|  | <p>MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ PRÓ-REITORIA DE PESQUISA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS</p> <p style="font-size: small;">Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil; CEP: 64049-550 Telefone (86) 3215-5734 _e-mail: ceepi@ufpi.edu.br</p> |  | | | | | | | | | | | | | | |
| <h3>CERTIFICADO</h3> | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <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> | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 30%;">Finalidade</td> <td>() Ensino (X) Pesquisa Científica</td> </tr> <tr> <td>Vigência da Autorização</td> <td>Abril/ 2018 à Abril/ 2020</td> </tr> <tr> <td>Espécie/Linhagem/raça</td> <td>Rato heterogênico/ wistar</td> </tr> <tr> <td>Nº de Animais</td> <td>340</td> </tr> <tr> <td>Peso/ Idade</td> <td>220-250g/ 8 semanas</td> </tr> <tr> <td>Sexo</td> <td>Machos</td> </tr> <tr> <td>Origem</td> <td>Biotério Central da UFPI.</td> </tr> </table> | | | Finalidade | () Ensino (X) 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. |
| Finalidade | () Ensino (X) 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 style="font-size: large; font-family: cursive;">Waldileny Ribeiro de Araújo Moura</p> <p style="font-size: small;">Profa. Dra. Waldileny Ribeiro de Araújo Moura Coordenador em Exercício da CEUA/UFPI</p> | | | | | | | | | | | | | | | | |

ANEXO B – Artigo enviado para publicação



Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle
In Association with the Society on Sarcopenia, Cachexia and Wasting Disorders
Open Access

Become a member of SCWD


Apply online for membership to the Society on Sarcopenia, Cachexia and Wasting Disorders.
[Apply for SCWD membership](#)

The Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle

is a peer-reviewed international journal dedicated to publishing materials that are related to cachexia and sarcopenia, as well as to body composition and its physiological and pathophysiological changes during the lifespan and in response to different illnesses from all fields of the life sciences. JCSM is published on behalf of the Society on Sarcopenia, Cachexia and Wasting Disorders SCWD.

ISSN: 2190-6009 (Electronic) 2190-5991 (Print)

Impact factor (2017): 12.511



Repercussions of cachexia in glycemic homeostasis of cancer patients: a systematic review

Amanda F. Braz^{1*}, Eduardo E. S. Vieira^{1*}, Guilherme T. Nogueira¹, Lorena B. de Oliveira¹, Danilo da F. R. Silva², Marília C. L. Seelaender³, Lucillia R. Torres⁴, Emídio M. de Matos-Neto⁵, Francisco L. Torres-Leal^{1‡}

¹Metabolic Diseases, Exercise and Nutrition Research Group (DOMEN), Department of Biophysics and Physiology, Federal University of Piauí, PI, Brazil.

²Oncology Sector, Oncoclinica, Prime Building, Teresina, PI, Brazil.

³Cancer Metabolism Research Group, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, SP, Brazil.

⁴Maranhão Federal Institute of Education, Science and Technology, Caxias, MA, Brazil.

⁵Metabolic Diseases, Exercise and Nutrition Research Group (DOMEN), Department of Physical Education, Federal University of Piauí, PI, Brazil.

*These authors contributed equally to this work.

‡Corresponding author at: torresleal@ufpi.edu.br (Francisco L. Torres-Leal), Metabolic Diseases, Exercise and Nutrition Research Group, Department of Biophysics and Physiology, Federal University of Piauí, PI, 64049-550, Brazil. Tel.: +55 86 3215-5871.

Abstract

Background: Cachexia is characterized as a multifactorial syndrome that results from a synergic combination of involuntary loss of lean mass – with or without depletion of the white adipose tissue (WAT) –, anorexia, energy expenditure increase and insulin resistance (IR). In cancer, cachexia is a frequent manifestation, which intensity is inversely proportional to the prognostic of the patient. The incidence of the tumor promotes a systemic inflammatory response that triggers metabolic alterations through diverse factors arriving from the tumor cells and host tissues. The inflammatory response inhibits the activity of the proteins from the insulin signaling pathway, which suppresses insulin actions and consequently contributes for the development of IR. The goal of this study was to investigate the repercussions of cachexia on glycemic homeostasis of cancer patients. **Methods:** A systematic review was performed of the articles published in the last ten years involving observational studies with adults. The search was developed in four different electronic databases: PubMed, Scopus, Web of Science and ScienceDirect. Two of the authors independently evaluated the studies discussing the relation between cachexia and dysregulated glycemic homeostasis. **Results:** 1.276 studies were identified during the search, of which 5 were selected and included in the review. Of 246 participants, 161 were cancer patients and 85 were non-oncologic controls with stable weight, which age varied between 51 ± 9 and 69 ± 11 years. The diagnosis of gastrointestinal cancer was predominant in these studies and the principal criteria for cachexia classification was a weight loss $\geq 5\%$ on the months preceding the recruitment. Diabetogenic markers were evaluated, including glucose and insulin levels during fasting, HOMA-IR index and insulin-like growth factor 1 (IGF-1) concentrations. One of the studies showed increased glucose levels in patients with cancer (WSC) and with cachexia (CC) when compared to control individuals. In contradiction, insulin levels were higher in the control group. Moreover, the HOMA-IR

index revealed contradictory results, with increased values in WSC or control group. IGF-1 concentrations did not differ between groups. **Conclusions:** Taking into account the conflicting results of this review, it remains unclear which are the repercussions of cancer-associated cachexia on glycemic homeostasis. Therefore, more studies are required for a better understanding of the implications of cachexia in glucose metabolism.

Keywords Cancer; Cachexia; Glucose; Insulin Resistance

1. Introduction

Cachexia is characterized as a multifactorial and systemic syndrome that results from the synergic combination between continuous and involuntary loss of lean mass – with or without depletion of the white adipose tissue –, anorexia and energy expenditure increase. Other symptoms, such as asthenia, fatigue, appetite alteration, intestinal absorption dysregulation, IR and nausea, are commonly observed in patients with cachexia [1,2].

This syndrome is commonly followed by chronic diseases, including cancer, renal disease, cardiac insufficiency and obstructive pulmonary disease [3]. In cancer, cachexia is a frequent manifestation, which intensity is inversely proportional to the prognostic of the patient. It constitutes the principal cause of death for approximately 20 to 40% of oncologic patients. The incidence of cachexia varies between different types of cancer: superior to 80% in pancreatic and gastrointestinal cancer; and approximately 60% in lung cancer [4,5].

Tumor cells are dependent on glucose as primary source of energy and mainly use glycolysis for adenosine triphosphate (ATP) synthesis [6]. However, glycolysis is 18 times less efficient than oxidative phosphorylation for ATP production [7]. Consequently, the tumor requires 40 times increased quantities of glucose for its growth [6]. The result of this reaction is the conversion of glucose into lactate, which can be used by other tissues or transported to the liver as a substrate for gluconeogenesis [8].

The presence of the tumor promotes a systemic inflammatory response that triggers metabolic alterations through different tumor and host tissue factors [9]. In cachexia, muscle and TAB loss is caused by the following mediators: proteolysis-

inducing factor (PIF), lipid mobilizer factor (LMF) and pro-inflammatory cytokines – tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interleukin-1 (IL-1) interleukin-6 (IL-6), which promote proteolysis and lipolysis [10]. The inflammatory response promoted by the release of tumor factors increases lipolysis – with consequent release of fatty acids and glycerol – together with activity inhibition of the proteins from the insulin signaling pathway, which suppresses insulin actions and contributes for the development of IR [11].

Cachexia has a complex physiopathology that involves a series of interactions between neurologic, metabolic, immunologic and endocrinologic mechanisms [3]. Although first described 2000 years ago, it remains a challenge for experimental and clinical studies due to its complex and frequently underdiagnosed manifestations [12]. Therefore, the objective of this study was to investigate through a systematic review the repercussions of cachexia on glycemic homeostasis of cancer patients.

2. Methods

2.1 Search strategy

A search was performed in four electronic databases: PubMed, Scopus, Web of Science and ScienceDirect. Descriptors were obtained from the list of *Medical Subject Headings (MeSH Terms)* and determined from the most commonly applied in scientific articles. The selected terms were combined with *Boolean* operators (“OR” and “AND”) and with a search by title, abstract and keywords to define the following equation to be inserted in the databases: (“neoplasms” OR “cancer” OR “oncology” OR “tumor” OR “tumour”) AND (“cachexia” OR “wasting”) AND (“glucose” OR “blood glucose” OR “glycated hemoglobin A” OR “insulin” OR “insulin resistance”). The search was restricted to the last ten years and to English, Spanish and Portuguese language.

2.2 Eligibility criteria

Observational studies were included, which involved adult men and women (age \geq 18 years) with a histological or clinical diagnosis of any type of cancer and evaluation of its relation to the dysregulation of glycemic homeostasis. An international criteria was adopted to determine cancer-associated cachexia [13]. Consequently, the patients have one of the following stages:

- Pre-cachexia: weight loss \leq 5% with anorexia and metabolic changes;

- Cachexia: weight loss > 5% or > 2% when associated to BMI < 20 Kg/m² or sarcopenia, food intake decrease or systemic inflammation;
- Refractory cachexia: variable degree in patients with advanced cancer, non-responding to anti-cancer treatments, intense catabolism, low performance score and life expectation inferior to 3 months.

Studies were excluded if (1) evaluated the association of cachexia to other diseases that not cancer - including chronic renal disease and cardiac insufficiency; (2) did not associate cancer, cachexia and glucose metabolism; (3) reviews, case reports, editorials, letters, book chapters, *in vitro* or animal studies; or (4) clinical studies, since the goal of this review was to investigate how the prognostic of the population evolved without any treatment.

2.3 Study selection and data extraction

Two authors (AFB and GTN) independently selected potentially relevant studies through analyses of titles and abstracts. The selected articles were read in their entirety and evaluated in accordance with the inclusion criteria mentioned above. Conflicts between the authors were resolved by reaching consensus or, when persisting, by consulting a third author (EESV). From each eligible study was extracted the following information: (1) publication details – authors and year; (2) type of study; (3) characteristics of the patients – type of cancer, cachexia criteria and diabetogenic markers (glucose and insulin levels under fasting, HOMA-IR index and IGF-1 concentrations).

2.4 Data quality assessment

The methodologic quality of the included studies was evaluated through the tool: *Standard Quality Assessment Criteria for Evaluating Primary Research Papers from a Variety of Fields*, developed by Kmet et al. [14].

3. Results

A total of 1.276 articles were identified through the developed search in the four databases. After excluding duplicate studies (n = 237), 1.039 articles were selected for title and abstract reading. 151 articles were still found duplicated and immediately removed, together with 996 other studies that included clinical and non-

human studies, and reviews. Hence, 43 studies were eligible for entire reading. After exclusion of 38 of these articles, which were not in accordance with the eligibility criteria, 5 were included in the review (*Fig1*).

The characteristics of the selected studies are summarized in Table 1. This review involved 246 individuals from whom 161 were cancer patients and 85 were non-oncologic controls with stable weight. The average age of the participants varied between 51 ± 9 and 69 ± 11 years. Two studies were developed with only male individuals [15,16] and the remaining ones included participants from both sexes [17-19].

The diagnosis of gastrointestinal cancer was predominant in the studies of Silvério et al. [17], Begenik et al. [18] and Agustsson et al. [19]. Winter et al. [15] studied patients with lung cancer and Smiechowska et al. [16] did not restrict the type of evaluated tumors. In the majority of studies [15,17-19] – with exception of Smiechowska et al. [16] -, cancer patients were absent of any treatment, including radiotherapy and/or chemotherapy.

The definition of cachexia varied among the studies. However, the syndrome was generally described as a weight loss equal or inferior to 5% in the months preceding the recruitment.

Begenik et al. [18] and Winter et al. [15] excluded participants with previous diagnose of diabetes, Silvério et al. [17] and Agustsson et al. [19] omitted this information and Smiechowska et al. [16] included an equal number of diabetic patients within the groups.

Several glyceic parameters were evaluated, including glucose [15,17-19] and insulin [17-19] levels under fasting. Agustsson et al. [19] also presented IGF-1 concentrations, while the glycated hemoglobin was not included in the studies. IR was estimated in only two studies [16,18] using HOMA-IR index (*Table 1*).

Regarding the relation between cancer-associated cachexia and the glyceic parameters, only one study [18] showed elevated glucose levels in the groups with cancer (WSC) and cachexia (CC) when compared to the control group. The remaining studies [15,17,19] did not observe any significant difference. Begenik et al [18] also observed increased insulin levels in the control group with stable weight. The evaluation of IR showed inconsistent results, with higher HOMA-IR values in the WSC [16] and control group with stable weight [18] (*Table 1*). In contradiction, IGF-1 concentrations were found stable among participants [19].

The methodologic quality of the included studies is provided in *Table 2*. Since the selected articles refer to case-control studies, randomized allocation and blinding criteria for researchers and individuals is not applied (items 5, 6 and 7). Moreover, in all the studies, the method for selecting participants, the size of sample and estimation of variance were not totally accurate (items 3, 9 and 11). The studies presented a conserved score above 75% (*Table 2*). Taking into account the heterogeneity of the evaluated parameters in the studies, it was not possible to develop a meta-analysis.

4. Discussion

Cachexia is a multifactorial syndrome characterized by systemic inflammation, anorexia and body weight reduction, which is caused by the loss of muscle mass and adipose tissue [20]. This syndrome is frequently accompanied by chronic diseases, including cardiac insufficiency and cancer [21]. Cancer-associated cachexia implicates a severe prognosis with poor quality of life and reduced lifespan [22].

In cancer patients, the progression of cachexia has been related to alterations in carbohydrates, lipids and proteins metabolism, IR, oxidative stress and energy expenditure increase [23]. In this study, we investigated through a systematic review, the impacts of cancer-associated cachexia in glucose metabolism-related components. A search process and systematic triage of articles published in the last 10 years lead to the inclusion of five observational case-control studies in the review.

From the selected studies, only Begenik et al. [18] found significantly different levels of fasting glucose between the groups. The oncologic patients with cachexia and stable weight presented higher concentrations of fasting glucose when compared to the control individuals ($90,17 \pm 5,17$ mg/dL and $83,96 \pm 5,28$ mg/dL, respectively). However, these levels are below the value (≥ 126 mg/dL) preconized by American Diabetes Association [24] for the diagnosis of diabetes. Other studies [15,17,25] also demonstrated similar concentrations of fasting glucose.

An increased endogenous production of glucose has been observed in patients with cancer-associated cachexia [15,25-27]. The tumor cells, which in normal conditions of oxygen availability and adequate mitochondrial functioning, still perform anaerobic metabolism (Warburg effect), may represent a mechanism that justifies this increase [28]. There is an elevated production of lactate - *aerobic lactogenesis* –, which is again converted in glucose in the liver (Cori Cycle) [8]. This process, which is also

sometimes denominated as “futile” cycle, is responsible for the increase of energy expenditure and gluconeogenesis [29].

The inflammatory response - with consequent production of pro-inflammatory cytokines – that is present in cachexia, also contributes for increased use of glucose and enhanced production of lactate [23]. Moreover, TNF- α participates in muscle protein degradation, which provides amino acids used as substrates for gluconeogenesis [7].

Chronic exposure to pro-inflammatory cytokines and also to sub-products of the tumor contributes to cachexia-associated IR [30]. Increased levels of TNF- α stimulate the receptors responsible for c-Jun N-terminal kinase (JNK) activation. JNK consequently promotes insulin receptor substrate-1 (IRS-1) phosphorylation in serine instead of tyrosine, which affects the insulin action [31]. Moreover, the increase in free fatty acids (AGLs) obtained through lipolysis, leads to activation of specific proteins, such as kinase protein C (PKC), which stimulates the inhibitory phosphorylation of IRS-1 in serine residues. AGLs are also able to infiltrate the skeletal muscle and disrupt insulin signaling [32].

A previous review [33] gathered controversial evidences regarding the relation between IR and body weight loss. A group of studies showed a similar development of IR in cancer patients with stable or decreased body weight [25,34], while other authors reported increased insulin levels associated with decreased body weight [35,36]. Similar results were observed in this review, with Smiechowska et al. [16] and Begenik et al. [18] findings of a higher HOMA-IR index in the groups of oncologic patients with stable weight and controls, respectively.

Besides the relation between HOMA-IR index and weight loss, it was also observed a direct association between leptin levels and IR. This may be explained by the presence of leptin receptors in β -pancreatic cells that consequently dysregulates insulin production [30].

Leptin concentrations are determined by fat storage and are normally related to appetite regulation and carbohydrates metabolism [5]. In cancer-associated cachexia, the role of leptin is still not well defined. Previous studies observed decreased leptin levels in patients with gastric cancer [37-39] while other authors demonstrated increased leptin concentrations in breast, gastrointestinal and gynecologic cancer [39-42].

The limitations of this review comprise reduced size of samples in each included study and heterogeneity in cancer diagnosis and related-evaluated parameters.

5. Conclusion

By considering the contradictory findings observed in this review, it remains unclear which are the repercussions of cancer-associated cachexia in glycemic homeostasis. Therefore, more studies are required for a better understanding of the implication of cachexia in glycemic metabolism of cancer patients, aiming for the development of effective therapeutic strategies.

Acknowledgments

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for the scholarship of master (Braz AF). This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001". This work was supported by grants from the Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq), (Process: 484778/2013-7 and 427893/2016-0) (Torres-Leal FL). The authors certify that they comply with the ethical guidelines for authorship and publishing of the Journal of Cachexia, Sarcopenia, and Muscle [43]. The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- [1] Lira FS, Rosa Neto JCR, Seelaender M. Exercise training as treatment in cancer cachexia. *Applied Physiology Nutrition and Metabolism*. 2014;39:679-86.
- [2] Fearon K, Arends J, Baracos V. Understanding the mechanisms and treatment options in cancer cachexia. *Nat Rev Clin Oncol*. 2013;10:90-9.
- [3] Krasnow SM, Marks DL. Neuropeptides in the pathophysiology and treatment of cachexia. *Curr Opin Support Palliat Care*. 2010;4:266-71.
- [4] Loureiro MM, Padrão AI, Duarte JA, Ferreira R. Impact of regular exercise on the muscle catabolism underlying the cachexia associated to cancer. *Radiat Phys Chem*. 2014;14:95-109.

- [5] Amitani M, Asakawa A, Amitani H, Inui A. Control of food intake and muscle wasting in cachexia. *Int J Biochem Cell Biol.* 2013;45:2179-85.
- [6] Tisdale MJ. Mechanisms of cancer cachexia. *Physiol Rev.* 2009;89:381-410.
- [7] Chevalier S, Farsijani S. Cancer cachexia and diabetes: similarities in metabolic alterations and possible treatment. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2014;39:643-53.
- [8] Keating E, Martel F. Antimetabolic Effects of Polyphenols in Breast Cancer Cells: Focus on Glucose Uptake and Metabolism. *Front Nutr.* 2018;5:25.
- [9] Argilés JM, Busquets S, Felipe A, López-Soriano FJ. Molecular mechanisms involved in muscle wasting in cancer and ageing: cachexia versus sarcopenia. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005;37:1084-104.
- [10] Silva FF, Ortiz-Silva M, Galia WBD, Cassolla P, Graciano MFR, Zaia CTBV, et al. Pioglitazone improves insulin sensitivity and reduces weight loss in Walker-256 tumor-bearing rats. *Life Sci.* 2017;171:68-74.
- [11] Oliver E, McGillicuddy F, Phillips C, Toomey S, Roche HM. The role of inflammation and macrophage accumulation in the development of obesity-induced type 2 diabetes mellitus and the possible therapeutic effects of long-chain n-3 PUFA. *Proc Nutr Soc.* 2010;69:232-43.
- [12] Seelaender M, Batista Júnior M, Lira F, Silveiro R, Rossi-Fanelli F. Inflammation in câncer cachexia: to resolve or not to resolve (is that the question?). *Clin Nutr.* 2012;31:562-6.
- [13] Fearon K, Strasser F, Anker SD, Bosaeus I, Bruera E, Jainsinger RL, et al. Definition and Classification of cancer cachexia: an international consensus. *Lancet Oncol.* 2011;12:489-95.
- [14] Kmet, L.M.; Lee, R.C.; Cook, L.S. Standard Quality Assessment Criteria for Evaluating Primary Research. Papers from a Variety of Fields. Alberta Heritage Foundation for Medical Research: Edmonton, Alberta, Canada, 2004.
- [15] Winter A, MacAdams J, Chevalier S. Normal protein anabolic response to hyperaminoacidemia in insulin-resistant patients with lung cancer cachexia. *Clin Nutr.* 2012;31:765-73.
- [16] Smiechowska J, Utech A, Taffet G, Hayes T, Marcelli M, Garcia JM. Adipokines in patients with cancer anorexia and cachexia. *J Investig Med.* 2010;58:554-9.
- [17] Silvério R, Lira FS, Oyama LM, do Nascimento CMO, Otoch JP, Alcantara PSM, et al. Lipases and lipid droplet-associated protein expression in subcutaneous white

adipose tissue of cachectic patients with cancer. *Lipids in Health Dis.* 2017;16:159-69.

[18] Begecik H, Aslan M, Dulger AC, Emre H, Kemik A, Kemik O, et al. Serum leptin levels in gastric cancer patients and the relationship with insulin resistance. *Arch Med Sci.* 2015;11:346-52.

[19] Agustsson T, Wikrantz P, Rydén M, Brismar T, Isaksson B. Adipose tissue volume is decreased in recently diagnosed cancer patients with cachexia. *Nutrition.* 2012;28:851-5.

[20] Argilés JM, Busquets S, López-Soriano FJ. Cancer cachexia, a clinical challenge. *Curr Opin Oncol.* 2019;31.

[21] Bindels LB, Neyrinck AM, Loumaye A, Catry E, Walgrave H, Cherbuy C, et al. Increased gut permeability in cancer cachexia: mechanisms and clinical relevance. *Oncotarget.* 2018;9:18224-38.

[22] Damrauer JS, Stadler ME, Acharyya S, Baldwin AS, Couch ME, Guttridge DC. Chemotherapy-induced muscle wasting: association with NF- κ B and cancer cachexia. *Eur J Transl Myol.* 2018;28:158-166.

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

[24] AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Introduction: Standards of Medical Care in Diabetes—2019. *Diabetes Care* Jan 2019, 42(supplement 1):S1-S2.

[25] Leij-Halfwerk S, Dagnelie PC, van Den Berg JW, Wattimena JD, Hordijk-Luijk CH, Wilson JP. Weight loss and elevated gluconeogenesis from alanine in lung cancer patients. *Am J Clin Nutr.* 2000;71:583-9.

[26] Zentella A, Manogue K, Cerami A, Cachectin/TNF-mediated lactate production in cultured myocytes is linked to activation of a futile substrate cycle. *Cytokine,* 1993,5:436-447.

[27] Tayek JA. A review of cancer cachexia and abnormal glucose metabolism in humans with cancer. *J Am Coll Nutr.* 1992;11:445-56.

[28] Liberti MV, Locasale JW. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends Biochem Sci.* 2016;41:211-8.

[29] Petruzzelli M, Wagner EF. Mechanisms of metabolic dysfunction in cancer-associated cachexia. *Genes Dev.* 2016;30:489-501.

[30] Dev R, Bruera E, Dalal S. Insulin resistance and body composition in cancer patients. *Ann Oncol.* 2018;29(supplement 2):ii18-ii26.

- [31] Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest*. 2006;116:1793-801.
- [32] Kaul K, Apostolopoulou M, Roden M. Insulin resistance in type 1 diabetes mellitus. *Metabolism*. 2015;64:1629-39.
- [33] Blum D, Omlin A, Baracos VE, Solheim TS, Tan BH, Stone P, et al. Cancer cachexia: a systematic literature review of items and domains associated with involuntary weight loss in cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2011;80:114-44.
- [34] Jatoi A, Foster N, Wieland B, Murphy B, Nikcevich D, LaPlant B, et al. The proteolysis-inducing factor: in search of its clinical relevance in patients with metastatic gastric/esophageal cancer. *Dis Esophagus*. 2006;19:241-7.
- [35] Novotny GW, Lundh M, Backe MB, Christensen DP, Hansen JB, Dahllöf MS, et al. Transcriptional and translational regulation of cytokine signaling in inflammatory β -cell dysfunction and apoptosis. *Arch Biochem Biophys*. 2012;528:171-84.
- [36] Fouladiun M, Körner U, Bosaeus I, Daneryd P, Hyltander A, Lundholm KG. Body composition and time course changes in regional distribution of fat and lean tissue in unselected cancer patients on palliative care--correlations with food intake, metabolism, exercise capacity, and hormones. *Cancer*. 2005;103:2189-98.
- [37] Nakajima TE, Yamada Y, Hamano T, Furuta K, Oda I, Kato H, et al. Adipocytokines and squamous cell carcinoma of the esophagus. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2010;136:261-6.
- [38] Bolukbas FF, Kilic H, Bolukbas C, Gumus M, Horoz M, Turhal NS, et al. Serum leptin concentration and advanced gastrointestinal cancers: a case controlled study. *BMC Cancer*. 2004;4:29.
- [39] Wallace AM, Kelly A, Sattar N, McArdle CS, McMillan DC. Circulating concentrations of "free" leptin in relation to fat mass and appetite in gastrointestinal cancer patients. *Nutr Cancer*. 2002;44:157-60.
- [40] Stattin P, Lukanova A, Biessy C, Söderberg S, Palmqvist R, Kaaks R, et al. Obesity and colon cancer: does leptin provide a link? *Int J Cancer*. 2004;109:149-52.
- [41] Bruun JM, Lihn AS, Verdich C, Pedersen SB, Toubro S, Astrup A, et al. Regulation of adiponectin by adipose tissue-derived cytokines: in vivo and in vitro investigations in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2003;285:527-33.
- [42] Tessitore L, Vizio B, Jenkins O, De Stefano I, Ritossa C, Argilés JM, et al. Leptin expression. In colorectal and breast cancer patients. *Int J Mol Med*. 2000;5:421-6.

[43] von Haehling S, Morley JE, Coats AJS, Anker SD. Ethical guidelines for publishing in the Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle: update 2017. J Cachexia Sarcopenia Muscle. 2017;8:1081–83.

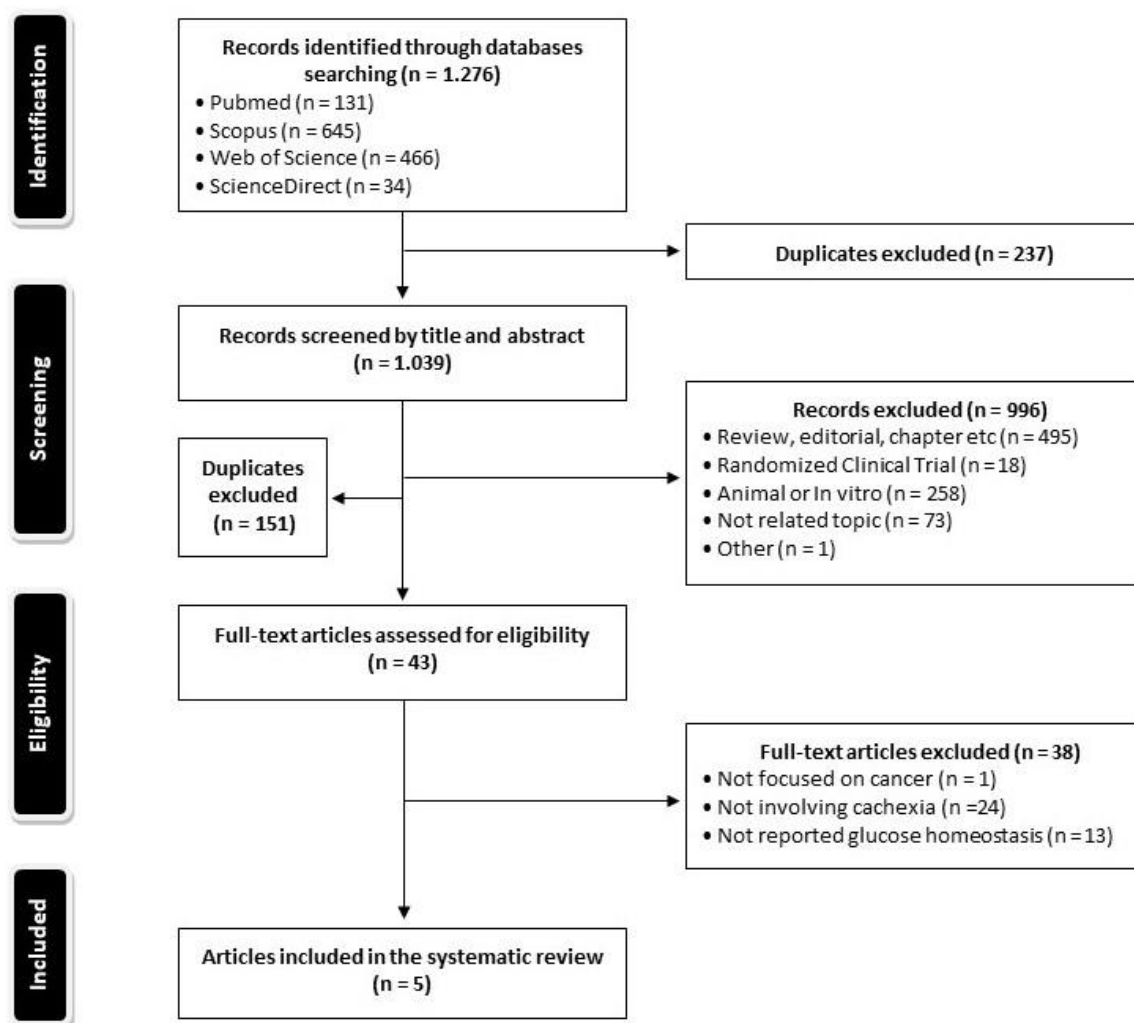


Fig1. Flowchart of identification and selection process for the inclusion of articles in the review.

Table 1. Characteristics of the included studies in the review.

| Author (year) | Type of study | Sex; Age (median: min. – max.) | Sample size | Diagnosed cancer | Cachexia criteria | Variables of interest | Principal findings |
|--------------------------------|---------------|-------------------------------------|---|------------------|---|------------------------------|---|
| Silvério et al. (2017) [17] | Case-control | 25 men and 22 women; 51,1 – 66,9 | CC (n = 17), WSC (n = 10) and control (n = 20) | GI CA | Weight loss > 5% in the last 6 months or > 2% in the last 6 months + BMI < 20 Kg/m ² | Glycose, insulin | Glycose and insulin with no difference (p > 0,05) |
| Begenik et al. (2015) [18] | Case-control | 30 men and 39 women; 51,0 – 59,0 | CC and WSC (n = 39), control (n = 30) | Gastric CA | IMC < 20 Kg/m ² | Glycose, insulin and HOMA-IR | Glycose ↑ in CC group WSC (p < 0,05). Insulin and HOMA-IR ↑ in control group (p < 0,05) |
| Agustsson et al. (2012) [19] | Case-control | Men and women; 62,5 – 64,9 | CC (n = 13), WSC (n = 17) and CA with gastrointestinal obstruction (n = 10) | GI CA | Weight loss > 5% in the last 3 months or > 10% during the previous 6 months | Glycose, insulin and IGF-1 | Glycose, insulin and IGF-1 with no difference (p > 0,05) |
| Winter et al. (2012) [15] | Case-control | 20 men; 63,0 – 66,0 | CC (n = 10) and control (n = 10) | Lung CA | Weight loss ≥ 5% in the last 12 months | Glycose | Glycose with no difference (p > 0,05) |
| Smiechowska et al. (2010) [16] | Case-control | 70 men; 64,0 – 69,0 | CC (n = 21), WSC (n = 24) and control (n = 25) | Diverse | Loss of at least 5% of pre-illness weight in the last 6 months | HOMA-IR | HOMA-IR ↑ in WSC group (p < 0,02) |

Control: individuals without cancer and with stable weight. CC = cancer-associated cachexia; WSC = cancer with stable weight; CA = cancer;

GI = gastrointestinal; NR = non-reported.

Table 2. Quality assessment of the included studies in the review.

| Criteria for the quality of quantitative studies | [17] | [18] | [19] | [15] | [16] |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1. Question/objective sufficiently described? | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| 2. Study design evident and appropriate? | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| 3. Method of subject/comparison group selection or source of information/input variables described and appropriate? | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 4. Subject (and comparison group, if applicable) characteristics sufficiently described? | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| 5. If interventional and random allocation was possible, was it described? | N/A | N/A | N/A | N/A | N/A |
| 6. If interventional and blinding of investigators was possible, was it reported? | N/A | N/A | N/A | N/A | N/A |
| 7. If interventional and blinding of subjects was possible, was it reported? | N/A | N/A | N/A | N/A | N/A |
| 8. Outcome and (if applicable) exposure measure(s) well defined and robust to measurement/misclassification bias? means of assessment reported? | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| 9. Sample size appropriate? | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 10. Analytic methods described/justified and appropriate? | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| 11. Some estimate of variance is reported for the main results? | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 12. Controlled for confounding? | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| 13. Results reported in sufficient detail? | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| 14. Conclusions supported by the results? | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Total score/possible maximum score | 19/22 | 19/22 | 19/22 | 19/22 | 19/22 |
| Quality score | 86,4% | 86,4% | 86,4% | 86,4% | 86,4% |

2 = yes; 1 = partial; N/A = not applicable.