



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

MAIARA CAROLINE COLOMBÉRA

**AVALIAÇÃO DA SUPLEMENTAÇÃO COM LEUCINA SOBRE
OS EFEITOS DE FATORES TUMORAIS EM CÉLULAS
MUSCULARES CARDÍACAS H9C2**

Campinas 2024

MAIARA CAROLINE COLOMBERA

AVALIAÇÃO DA SUPLEMENTAÇÃO COM LEUCINA SOBRE OS
EFEITOS DE FATORES TUMORAIS EM CÉLULAS MUSCULARES
CARDÍACAS H9C2

*Dissertação de mestrado apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual de Campinas como
parte dos requisitos exigidos para obtenção do Título de
Mestra em Biologia Molecular e Morfofuncional, na área
de Fisiologia.*

Orientadora: Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes

Coorientadora: Gabriela de Matuoka e Chiocchetti

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE
À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELA ALUNA MAIARA CAROLINE
COLOMBERA E ORIENTADA PELA
MARIA CRISTINA CINTRA GOMES MARCONDES.

CAMPINAS

2024

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

C716a Colombero, Maiara Caroline, 1995-
Avaliação da suplementação com leucina sobre os efeitos de fatores tumorais em células musculares cardíacas H9c2 / Maiara Caroline Colombero. – Campinas, SP : [s.n.], 2024.

Orientador: Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes.
Coorientador: Gabriela de Matuoka e Chiocchetti.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Instituto de Biologia.

1. Caquexia. 2. Coração - Câncer. 3. Leucina. 4. Técnicas *in vitro*. I. Gomes-Marcondes, Maria Cristina Cintra, 1961-. II. Chiocchetti, Gabriela de Matuoka e. III. Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: Evaluation of leucine supplementation on the effects of tumor factors in H9c2 cardiac muscle cells

Palavras-chave em inglês:

Cachexia

Heart - Cancer

Leucine

In vitro techniques

Área de concentração: Fisiologia

Titulação: Mestra em Biologia Molecular e Morfofuncional

Banca examinadora:

Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes [Orientador]

Helena Cristina de Lima Barbosa

Roger Frigério Castilho

Data de defesa: 10-07-2024

Programa de Pós-Graduação: Biologia Molecular e Morfofuncional

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-5718-5865>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/1604350940153470>

Campinas, 10 de julho de 2024.

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes

Profa. Dra. Helena Cristina de Lima Barbosa

Prof. Dr. Roger Frigério Castilho

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa de Biologia Molecular e Morfofuncional do Instituto de Biologia.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processos números 2020/13222-5, 2022/07126-9 e 2017/02739-4, pelo apoio financeiro do qual tornou possível a realização desse trabalho e a oportunidade de estágio em pesquisa no exterior.

Agradeço à CAPES pelo financiamento dessa pesquisa. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Agradeço ao meu pai e à minha mãe por sempre me apoiarem e me darem suporte durante toda minha jornada acadêmica sendo fundamental para que eu chegasse até aqui. Agradeço à minha irmã, que também sempre me apoiou e me incentivou em minhas escolhas, e me deu uma sobrinha. À Helena, minha sobrinha e afilhada, que veio ao mundo para dar cores aos dias cinzas e me arrancar sorrisos em momentos de desespero, além das ideias geniais como pedir para meu pai construir um laboratório no quintal para que não precisasse ir para outra cidade estudar, e ficar tanto tempo longe dela (é não funcionou...). Agradeço aos demais familiares, em especial aquelas que me acompanharam mais de pertinho.

Um agradecimento especial à Professora Maria Cristina por ter aberto as portas do laboratório para mim durante a graduação e por ter me orientado por todos esses anos, muito obrigada por toda a dedicação e ensinamentos para além da academia. Também agradeço especialmente a Gabriela, que não só me coorientou, mas também foi inspiração tanto como pessoas quanto profissional, muito obrigada por sempre acreditar em mim, muitas vezes mais do que eu mesma, e pelos empurrões, você foi fundamental para meu crescimento.

A todo o pessoal do Laboratório de Nutrição e Câncer, aos que já concluíram suas atividades, Bread, André, Nathália, Guilherme, Melina, e aos que continuam, Laís, Leisa, Carla, Ninón, Rogério, Ianca, muito obrigada por compartilharem seus conhecimentos e pela paciência nos ensinamentos. Um agradecimento especial ao André e Ninón por terem contribuído diretamente no desenvolvimento deste trabalho ajudando na execução de análises. Agradeço também a todos os alunos e alunas de IC que passaram pelo lab e às alunas e alunos que estão chegando.

Agradeço ao Professor Dr. Paolo Porporato e a Professora Dr^a Alessandra Ghigo pela oportunidade de estágio no “Molecular Biotechnology Center – UniTo” e por terem me

recebido tão bem, agradeço também aos seus respectivos alunos por todo o acolhimento e suporte no período em que estive lá. Um muito obrigada também ao Diretor Dr. Emilio Hirsch pela receptividade e pela gentileza das trocas de palavras em português.

Agradeço a todos os Professores que participaram do meu processo de formação, desde os anos iniciais da educação escolar até o ensino superior, em especial a Professora Cristina Vicente e o Professor Claudio Werneck que abriram as primeiras portas da pesquisa para mim.

Agradeço à todas as minhas amigas, desde aquelas que cresceram comigo em Limeira até as mais recentes que também foram abrigo na cidade da laranja, à todas que conheci na trajetória universitárias nos diversos cantos da UNICAMP ou nas encruzilhadas de Barão Geraldo e que foram afeto para além desses ambientes. Agradeço à todas e todos que em algum momento compartilharam o teto comigo e ganharam espacinho como irmã ou irmão no meu coração. Agradeço às amigas brasileiras que foram abrigo e aconchego em terras italianas e também as amigas e amigos não brasileiras(os) que habitaram terras torinesas e dividiram momentos comigo durante o período de estadia no exterior.

Por último, e não menos importante, agradeço a minha psicanalista Angela que me acompanha desde o início do mestrado, sendo fundamental no meu processo de formação tanto como mestre quanto como pessoa.

RESUMO

A caquexia cardíaca do câncer é uma complicação grave e debilitante caracterizada por disfunções cardíacas associadas à evolução do tumor, porém é frequentemente subestimada e pouco estudada. Devido as dificuldades de realização de ensaios clínicos por conta dos efeitos coadjuvantes de terapias antineoplásicas e limitações nas análises biomoleculares e bioquímicas em pacientes, os experimentos em modelos pré-clínicos são essenciais para uma melhor compreensão dos mecanismos e para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas. A leucina, um aminoácido essencial de cadeia ramificada, demonstra participar de processos regulatórios no músculo esquelético caquético no contexto do câncer, em vias que também estão frequentemente alteradas na caquexia cardíaca, como vias de síntese proteica, atividade mitocondrial, proteólise e apoptose. Porém, a função da leucina no tecido cardíaco ainda é desconhecida. Sendo assim, o presente trabalho propõe avaliar o efeito da evolução do tumor e da leucina em células musculares cardíacas H9c2. Para este fim, a caquexia cardíaca foi mimetizada em dois modelos experimentais *in vitro*, um deles com líquido ascítico e o outro com soro de ratos caquéticos, portadores de Tumor de Walker-256. Os resultados revelaram diminuição significativa na viabilidade celular das células musculares cardíacas quando expostas ao líquido ascítico. Além disso, observou-se redução na expressão da proteína do complexo II da cadeia de transporte de elétrons da fosforilação oxidativa - OXPHOS - nessas células, sugerindo efeito direto e/ou indireto da evolução tumoral na ocorrência de disfunção mitocondrial associada à caquexia cardíaca. Em relação à leucina, nas condições experimentais aqui avaliadas, não foram observadas alterações significativas quanto a viabilidade celular, taxa de consumo de oxigênio e expressão de actina e miosina, prejudicadas em função à exposição ao soro de ratos caquéticos. Essas descobertas fornecem *insights* importantes sobre possíveis alterações metabólicas e mitocondriais subjacentes à caquexia cardíaca do câncer, destacando a necessidade de maiores investigações para o melhor direcionamento de intervenções terapêuticas.

ABSTRACT

Cancer cardiac cachexia is a severe and debilitating complication characterised by cardiac dysfunctions associated with tumour progression, but it is often underestimated and poorly studied. Given the difficulties of conducting clinical trials due to the added effects of antineoplastic therapies and constraints in biomolecular and biochemical analyses of patients, it is crucial to conduct experiments in preclinical models. This is essential for gaining a deeper understanding of the mechanisms involved and for developing effective therapeutic strategies. Leucine, an essential branched-chain amino acid, has been shown to play an important role in regulating processes in skeletal muscle wasting in the context of cancer. These processes are often altered in cardiac cachexia, including protein synthesis pathways, mitochondrial activity, proteolysis, and apoptosis. However, the function of leucine in cardiac tissue is still unknown. Therefore, the present study aims to evaluate the effect of tumour progression and leucine on H9c2 cardiac muscle cells, mimicking cardiac cachexia *in vitro* using two experimental models, with ascitic fluid or serum from cachectic Walker-256-bearing rats. The results revealed a significant decrease in the viability of cardiac muscle cells when exposed to ascitic fluid. Additionally, there was an observed reduction in the expression of complex II of the electron transport chain of oxidative phosphorylation (OXPHOS) in these cells. This suggests mitochondrial dysfunction associated with cardiac cachexia. With regards to leucine treatment, there were no significant changes observed in cell viability, oxygen consumption, or actin and myosin expression, despite the profound alterations produced by exposure to cachectic serum. These findings provide valuable insights into the possible metabolic and mitochondrial alterations underlying cancer cardiac cachexia, emphasizing the necessity for further investigation to improve the targeting of therapeutic interventions.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Modelos <i>in vitro</i> que avaliam possíveis efeitos que mimetizam a caquexia cardíaca em vias mitocondriais.....	30
Tabela 2. Dados dos genes utilizados para expressão proteica da Troponina T e <i>housekeeping</i> GAPDH.....	42
Tabela 3. Citocinas pró-inflamatória e anti-inflamatória detectadas no líquido ascítico, inativado ou não e no soro de animais caquéticos ou saudáveis	45
Tabela Suplementar 1: Concentração média de metabólitos no líquido ascítico e líquido ascítico inativado (mM)	77

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Efeito Crosstalk entre tumor, células estromais e sistema imunológico produzindo fatores que atingem diferentes órgãos e tecidos e sistema nervoso central causando efeitos catabólicos.....	23
Figura 2. Biomarcadores chave para a caquexia cardíaca do câncer.....	27
Figura 3. Modelo experimental I	34
Figura 4. Modelo experimental II.....	35
Figura 5. Grupos experimentais obtidos dos dois modelos propostos	36
Figura 6. Concentração de metabólitos presente no líquido ascítico e líquido ascítico inativado	46
Figura 7. Vias impactadas em função do perfil metabólico do líquido ascítico e líquido ascítico inativado, aos quais as células H9c2 foram expostas.....	47
Figura 8. Viabilidade celular de cardiomioblastos H9c2 controle e expostos à 5% de líquido ascítico e de líquido ascítico inativado por 48h	47
Figura 9. Taxa de consumo de oxigênio (TCO) de cardiomioblastos H9c2 controle e expostos à 5% de líquido ascítico e de líquido ascítico inativado por 48h	48
Figura 10. Potencial de membrana mitocondrial de cardiomioblastos H9c2 controle e expostos à 5% de líquido ascítico e de líquido ascítico inativado por 48h	49
Figura 11. Expressão das proteínas OXPHOS em cardiomioblastos H9c2 controle, expostos à 5% de líquido ascítico e de líquido ascítico inativado por 48h	50
Figura 12. <i>Screening</i> da expressão de proteínas em cardiomioblastos H9c2 controle, expostos à 5% de líquido ascítico e de líquido ascítico inativado por 48h	51
Figura 13. Células H9c2 não diferenciadas em comparação às células diferenciadas	52
Figura 14. Expressão proteica e expressão gênica de marcadores de diferenciação das células H9c2	53
Figura 15. Células H9c2 diferenciadas tratadas com 5% de soro de ratos saudáveis em comparação às células H9c2 diferenciadas tratadas com 5% de soro de ratos caquéticos portadores de tumor de Walker-256	53
Figura 16. Viabilidade celular de cardiomiócitos H9c2 expostos à 5% de soro de ratos saudáveis e a 5% de soro de ratos caquéticos portadores de tumor de Walker-256 tratados com leucina por 48h	54

Figura 17. Taxa de consumo de oxigênio (TCO) de cardiomiócitos H9c2 expostos à 5% de soro de ratos saudáveis e a 5% de soro de ratos caquéticos portadores de tumor de Walker-256 e ao tratamento com leucina 250 μ M por 48h..... 55

Figura 18. Imunofluorescência de miosina e actina de cardiomiócitos H9c2 expostos à 5% de soro de ratos saudáveis e a 5% de soro de ratos caquéticos portadores de tumor de Walker-256, e tratados ou não com leucina 250 μ M por 48h 56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4EBP - Proteína de ligação ao fator de iniciação de tradução eucariótico 4E 1
Ahsg (fetuín-A) - Glicoproteína Alpha-2-HS
AKT - Proteína quinase B
AMPK - 5' Proteína quinase ativada por AMP
ANP - Peptídeo natriurético atrial
ATCC - Coleção de Culturas Tipo Americanas
ATG5 - Proteína autofágica 5
Atrogin-1/MAFbx - Proteína F-box específica do músculo
BNIP3 – Proteína 3 de interação com a proteína BCL2
BNP - Peptídeo natriurético tipo B
C/EBP β - CCAAT/proteína de ligação ao intensificador beta
CCCP - Carbonil cianeto m-clorofenil- hidrazona
cfos - Protooncogene Fos
C-kit protein - Receptor de tirosina quinase proto-oncogene KIT
CPTI β - Carnitina palmitoiltransferase I do músculo suíno
CRP - Proteína C-reativa
CT26 - Carcinoma colorretal murino
CTSL - Catepsina L
EROs – Espécies Reativa a Oxigênio
FABP4 - Proteína de Ligação a Ácidos Graxos 4
FEVE - Fração de Ejeção do Ventrículo Esquerdo
Fga - Fibrinogênio em sóleo
Fgg - Fibrinogênio cardíaco
FOXO - Proteína Forkhead box O
FW – Fator Walker
Gabarapl - Proteína associada ao receptor do ácido gama-aminobutírico
G-CSF - Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos
GDF15 - Fator de crescimento/diferenciação 15
GLOBALCAN - Observatório Global do Câncer
GLUT - Transportadores de glicose
GSK-3B - Quinase 3 beta sintetizadora de glicogênio
HGB - Hemoglobina

HIF-1 α - Fator Induzível por Hipóxia 1-alfa
HMBG-1 - Grupo de Alta Mobilidade 1
HSP - Proteínas de choque térmico
IARC - Agência Internacional de Pesquisa em Câncer
IC – Insuficiência Cardíaca
IF3-f - Domínio terminal f do fator de iniciação de tradução 3
IFN - Interferon
IL - Interleucina
IMC - Índice de massa corporal
INCA - Instituto Nacional de Câncer
IP-10 - Ligante de quimiocina de motivo C-X-C 10
LC3- A/B - Cadeia leve 3B das proteínas associadas a microtúbulos 1A/1B
LETM1 - Proteína Transmembrana Contendo Zíper de Leucina-EF-Hand 1
LIF - Fator Inibidor de Leucemia
LLC - Carcinoma pulmonar de Lewis
LMF - Fator de Mobilização de Lipídios
MAP1LC3B/LC3 - Proteínas associadas a microtúbulos 1A/1B A cadeia leve 3A
MC – Meio Condicionado
Mfn2 - Mitofusina 2
MHC - Cadeia pesada de miosina
miR – MicroRNA
MMPs - Metaloproteinases da Matriz
MPO - Mieloperoxidase
mRNA - RNA mensageiro
mTOR - Alvo da rapamicina em mamíferos
mTORC1 - Complexo 1 do alvo da rapamicina em mamíferos
MuRF-1 - E3 ubiquitina-proteína ligase TRIM63
MYL1 - Gene codificador de proteínas da cadeia leve 1 da miosina
MyoD - Proteína 1 de determinação de mioblastos
NF- κ B - Factor nuclear kappa B
NGF - Fator de Crescimento Nervoso
Nme2 - Nucleosídeo difosfato quinase B
OXPHOS - Sistema de Fosforilação Oxidativa Mitocondrial
PAI-1 - Inibidor do ativador do plasminogênio 1

PCR - Proteína C-reativa

PGE2 - Prostaglandina E2

PIF - Fator Indutor de Proteólise

PPAR α mRNA - RNA mensageiro para receptores ativados por proliferadores peroxissomas do tipo alfa

RAF6 - Fator Associado ao Receptor de Necrose Tumoral 6

S6rp - Proteína ribossomal S6

SDS - Cadeia leve de miosina solúvel 1

Selp - P-selectina

SNC - Sistema Nervoso Central

STAT3 - Transdutor de sinal e ativador da transcrição 3

TGF - Fator de Crescimento Transformador β

TIMP-1 - Inibidor tecidual de metaloproteinases 1

TIMPs - Inibidores Teciduais de Metaloproteinases

TNF - Fator de Necrose Tumoral

TNF-R - Receptor do fator de necrose tumoral

TWEAK/ TNFSF12 - Indutor fraco de apoptose semelhante ao fator de necrose tumoral

/ Membro 12 da superfamília do fator de necrose tumoral

UCP3 - Proteína de desacoplamento mitocondrial 3

V dac1 - Canal 1 seletivo de ânion dependente de voltagem

WHO - Organização Mundial da Saúde

ZIP 14 (Zinc) - Transportador de zinco

SUMÁRIO

1.	Introdução	17
2.	Revisão bibliográfica	18
2.1.	Câncer	18
2.2.	Caquexia do Câncer	19
2.3.	Mecanismos da Caquexia do Câncer	20
2.4.	Caquexia Cardíaca	24
2.5.	Estratégia Terapêutica na Caquexia Cardíaca: A Leucina como uma possibilidade co-adjuvante	31
3.	Justificativa	32
4.	Objetivos	33
5.	Objetivos específicos:	33
6.	Materiais e Métodos	33
6.1.	Modelos experimentais	33
6.2.	Modelo experimental I	34
6.3.	Modelo experimental II	35
6.4.	Obtenção das amostras de líquido ascítico e soro de ratos	36
6.5.	Manutenção da cultura celular	38
6.6.	Estabelecimento de protocolo de diferenciação celular	38
6.7.	Análises bioquímicas e moleculares	38
6.7.1.	Determinação de citocinas pró-inflamatórias no soro e no líquido ascítico e análise metabolômica do líquido ascítico	38
6.7.2.	Ensaio de viabilidade celular	40
6.7.3.	Expressão proteica	41
6.7.4.	Expressão gênica	42
6.7.5.	Respiração Celular	42
6.7.6.	Potencial de membrana mitocondrial	43
6.7.7.	Imunofluorescência	44

6.7.8.	Análise dos resultados	44
7.	Resultados.....	44
7.1.	Citocinas pró-inflamatórias	45
7.2.	Perfil metabólico do líquido ascítico e líquido ascítico inativado.....	45
7.1.	Modelo Experimental I.....	46
7.1.1.	Viabilidade, respiração celular e potencial de membrana mitocondrial das células H9c2 expostas ao líquido ascítico	46
7.1.2.	Expressão de proteínas relacionada às vias mitocondriais, autofagia e marcador de dano cardíaco das células H9c2 expostas ao líquido ascítico.....	50
7.2.	Modelo Experimental II.....	51
7.2.1.	Verificação do protocolo de diferenciação celular.....	51
7.2.2.	Curva dose-resposta à Leucina e tratamento com Leucina em células H9c2 diferenciadas expostas ao soro de ratos	53
7.2.3.	Respiração celular das células H9c2 diferenciadas expostas aos tratamentos com soro de rato saudável e de soro de rato caquético	54
7.2.4.	Imunofluorescência das células H9c2 diferenciadas expostas aos tratamentos com soro de rato.....	55
8.	Discussão	57
9.	Conclusão	64
10.	Referências Bibliográficas.....	65
11.	Apêndice.....	76
12.	Anexos.....	77

1. Introdução

O câncer pode causar uma série de complicações clínicas, entre elas, está a caquexia, uma síndrome complexa, sistêmica e multifatorial, que afeta cerca de 50 a 80% dos pacientes com câncer avançado, sendo frequentemente relacionada ao mau prognóstico, e responsável por cerca de 20% de todas as mortes relacionadas ao câncer (Tisdale, 2002; Argilés *et al.*, 2014). A caquexia implica em diversas alterações metabólicas e afeta múltiplos órgãos, incluindo tecido adiposo, osso, cérebro, fígado, trato gastrointestinal, rim, pulmão e coração, devido à mecanismos que atuam à nível sistêmico, como a inflamação causada pelos elevados níveis circulatórios de citocinas e fatores tumorais (Argilés *et al.*, 2019; Baracos *et al.*, 2018; da Fonseca *et al.*, 2020).

A caquexia cardíaca é uma das consequências decorrente de alterações cardíacas nos pacientes com câncer e, infelizmente, é frequentemente subestimada e pouco estudada (Argilés *et al.*, 2019; Schmidt *et al.*, 2018). A caquexia cardíaca descreve a atrofia, remodelação e disfunção cardíaca associadas a evolução do tumor (Murphy, 2016), podendo acarretar a insuficiência cardíaca (Boer *et al.*, 2020). Porém, as terapias antineoplásicas também afetam a função do órgão, o que dificulta a realização de ensaios clínicos, além do fato de que em estudos em humanos não é possível avaliar os biomarcadores cardíacos específicos como é possível em estudos pré-clínicos, em animais ou em células (Ewer 2015; Bagnall *et al.*, 2023). Considerando a importância do coração como órgão vital e que os mecanismos das alterações cardíacas como consequência do câncer ainda não estão completamente elucidados, os experimentos em modelos pré-clínicos são essenciais para melhor compreensão dos mecanismos, para então desenvolver estratégias terapêuticas (Boer *et al.*, 2020).

Consensualmente, a caquexia e a função cardíaca diminuída não podem ser totalmente revertidas pelo suporte e aumento nutricional convencional (Tian *et al.*, 2010; Fearon *et al.*, 2011) e o tratamento precoce, antes que as alterações clínicas sejam observadas, pode melhorar a função cardíaca e levar a melhores resultados para os pacientes (Bagnall *et al.*, 2023). A leucina é um dos três aminoácidos essenciais de cadeia ramificada, demonstrando participar de processos regulatórios no músculo esquelético caquético. Esse aminoácido, além de servir como substrato, atua com efeitos positivos na sinalização em vias de síntese proteica, de proteólise e de apoptose, além de efeitos modulatórios na atividade mitocondrial, como aumento da taxa de consumo de oxigênio e biogênese mitocondrial do músculo esquelético (Ventrucci *et al.*, 2004; Gonçalves *et al.*, 2013; Cruz *et al.*, 2017; Cruz *et al.*, 2020). Desse

modo, a leucina pode modular as vias e processos que são frequentemente alteradas, no tecido cardíaco sob influência da caquexia do câncer, assim como é verificado no tecido muscular esquelético, minimizando a proteólise e aumentando a síntese proteica, além de minimizar a morte celular (Murphy, 2016; Berent *et al.*, 2019). Estudo realizado no laboratório de Nutrição e Câncer, da Unicamp, mostrou que a dieta rica neste aminoácido melhorou parâmetros funcionais cardíacos, com redução do risco de morte súbita em ratos portadores de tumor, acompanhada da modulação da proteólise e apoptose dos cardiomiócitos (Toneto *et al.*, 2016), mas não se sabe em quais vias específicas a leucina pode ter atuado e se pode ter modulado outras alterações.

Considerando a função da leucina mas, também, levando em conta que músculo esquelético e o cardíaco apresentam diferentes dinâmicas, assim como suas respostas aos mesmos estímulos, como ao próprio processo da caquexia, e que os estudos em relação ao coração são escassos (Shum *et al.*, 2015; Rausch *et al.*, 2021; Bagnall *et al.*, 2023), melhor compreensão do tecido cardíaco é necessário, tanto para entender como a leucina pode influenciar a resposta desse órgão, quanto para pensar em possíveis estratégias terapêuticas considerando vias específicas que podem ter maior influência no coração.

2. Revisão bibliográfica

2.1. Câncer

O câncer é uma enfermidade caracterizada pela proliferação descontrolada de células, que podem invadir tecidos e órgãos adjacentes e/ou espalharem-se para outras regiões do corpo, resultando em várias alterações clínicas, estando entre as 10 principais causas de morte no mundo (WHO, 2020; INCA, 2022).

De acordo com estatísticas compiladas pela GLOBALCAN, baseada em dados elaborados pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC), em 2020, ocorreram cerca de 19,3 milhões de novos casos de câncer a nível global e 10 milhões de morte por câncer (IARC, 2020). No ano de 2018, a estimativa apontou que houve 18,1 milhões de casos novos e 9,6 milhões de morte (IARC, 2018), mostrando aumento na incidência e na morte relativas a esta doença. Segundo a IARC, uma a cada cinco pessoas no mundo terá câncer e uma a cada 10 pessoas morrerá da doença, e de acordo com evidências científicas, pelo menos 40% dos casos poderiam ser evitados com medidas eficazes de prevenção primária (IARC, 2020; WHO, 2020).

Mundialmente, a Europa responde por 22,8% do total de casos de câncer e 19,6% das mortes por câncer, seguida pelas Américas com 20,9% do total de casos e 14,2% do total de mortes (Sung *et al.*, 2021). No âmbito nacional, de acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), são esperados 704 mil novos casos de câncer no Brasil para cada ano entre 2023 e 2025, com destaque para a região Sul e Sudeste, com cerca de 70% de incidência (INCA, 2022).

O câncer de mama feminino é o que apresenta maior incidência no mundo, representando 11,7% do total de casos, com 2,3 milhões de mulheres diagnosticadas, seguido pelo de pulmão (11,4%), colorretal (10,0%), próstata (7,3%) e estômago (5,6%). Já o câncer de traqueia, brônquios e pulmão foi a principal causa de morte por câncer, com aproximadamente 1,8 milhão de óbitos (18%), seguido pelo câncer colorretal (9,4%), de fígado (8,3%), de estômago (7,7%) e de mama feminino (6,9%) (IARC, 2020; WHO, 2020).

Já no Brasil são esperados 704 mil novos casos de câncer para cada ano, entre 2023 e 2025 e o tumor maligno mais incidente é o de pele não melanoma, representando 31,3% do total de casos, seguido pelos de mama feminino (10,5%), próstata (10,2), cólon e reto (6,5%), pulmão (4,6%) e estômago (3,1%) (INCA, 2022).

2.2. Caquexia do Câncer

A caquexia do câncer foi definida por Fearon e colaboradores como uma síndrome complexa e multifatorial caracterizada pela perda progressiva de massa muscular esquelética (com ou sem perda de massa adiposa) que não pode ser totalmente revertida por suporte nutricional convencional e leva ao comprometimento funcional progressivo (Fearon *et al.*, 2011). Esta síndrome é responsável por cerca de 20% das mortes relacionadas ao câncer, afetando entre 50 a 80% dos pacientes com câncer avançado devido às alterações sistêmicas causadas pela evolução do tumor (Argilés *et al.*, 2014; von Haehling; Anker; Anker, 2016). O quadro de caquexia tem alta predominância em pacientes com câncer pancreático, de fígado, gastroesofágico, colorretal, pulmão, de cabeça e pescoço e ovariano, não se restringindo apenas a estes, mas variando em relação à predominância de acordo com cada estudo e critério de avaliação, além de também variar de acordo com o estágio da doença, comorbidades e o tipo de tratamento realizado (Baracos *et al.*, 2018; Cong *et al.*, 2020; Poisson *et al.*, 2021; Bossi *et al.*, 2021).

Apesar da alta incidência e do crescente número de estudos, os dados ainda são escassos e existem dificuldade na clínica para a implementação prática de critérios diagnósticos para a caquexia devido à complexidade da avaliação da perda de massa muscular esquelética.

Fearon e colaboradores adotaram alguns critérios para a classificação clínica de caquexia que são usados até hoje como: (1) perda de peso superior a 5% nos últimos 6 meses, (2) índice de massa corporal (IMC) inferior a 20 kg/m² ou (3) perda de peso de 2% ou mais, em pacientes com sarcopenia (Fearon *et al.*, 2011; McDonald *et al.*, 2023). Outros autores também pontuaram outros critérios importantes que podem ser adotados no diagnóstico da caquexia, como: (1) diminuição da força muscular, (2) fadiga, (3) anorexia, (4) índice de massa livre de gordura baixo e (5) bioquímica anormal, que inclui aumento de marcadores inflamatórios (proteína C reativa – CRP > 5,0mg/L, interleucina – IL-6 > 4,0pg/mL), anemia (hemoglobina – HGB < 12g/dL) e baixa concentração de albumina sérica (Alb < 3,2g/dl)(Ni; Zhang, 2020).

2.3. Mecanismos da Caquexia do Câncer

A caquexia relacionada ao câncer implica em alterações no metabolismo de carboidratos, lipídios, proteínas, alterações neuro-hormonais, anemia e disfunção mitocondrial; e como consequências ocorre perda muscular progressiva, fraqueza generalizada, e emagrecimento acentuado (Argilés *et al.*, 2014; Argilés, *et al.*, 2019; Dolly *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2022).

A alteração no metabolismo de proteínas causa desequilíbrio entre os processos anabólicos e catabólicos no músculo, devido à redução na síntese de proteínas e ao aumento da degradação proteica, o que provavelmente causa a atrofia muscular. A maioria dos estudos é realizado em modelos pré-clínicos, *in vivo* e *in vitro*, onde é possível investigar estas vias, porém ainda há pouca informação disponível sobre a renovação de proteínas musculares em pacientes com câncer e caquexia (Baracos *et al.*, 2018; Martin *et al.*, 2023).

Uma das principais vias envolvidas no processo de degradação de proteínas é a via mediada pela ativação da via ubiquitina-proteassoma, que demonstrou hiperatividade e relação inversa entre a expressão muscular de mRNA de ubiquitina e o nível de perda de peso em paciente com câncer e caquexia (Khal *et al.*, 2005; Argilés, Busquets, *et al.*, 2019; da Fonseca *et al.*, 2020). Diferentes classes de enzimas estão envolvidas na ubiquitinação para que as proteínas possam ser degradadas pela subunidade proteassomal 26S. As enzimas ligases MuRF-1 e Atrogin-1/MAFbx foram as primeiras a serem identificadas com o papel de perda muscular dentro desta via e são consideradas genes mestres na atrofia muscular, sendo ambas altamente reguladas em modelos animais de câncer caquexia (Han; Mitch, 2011; Sandri, 2016; Cao *et al.*, 2021). Foi postulado que a MuRF-1 pode ser responsável pela degradação de proteínas musculares contráteis e estruturais, como actina, troponina-1, miosina de cadeia pesada e cadeia

leve, proteína C ligante de miosina, e proteínas associadas à glicólise/glicogenólise, enquanto a Atrogin-1/MAFbx promove a degradação de MyoD, fator de transcrição muscular e IF3-f, ativador de síntese de proteínas, sendo assim, a Atrogin-1 está envolvida no prejuízo do processo da síntese de proteínas musculares, mas também interage com proteínas sarcoméricas, incluindo miosinas, desmina e vimentina, bem como fatores de transcrição, componentes da maquinaria de tradução, enzimas envolvidas na glicólise e gluconeogênese e, também, proteínas mitocondriais (Sandri, 2016; da Fonseca *et al.*, 2020). Essas alterações na MuRF-1 e Atrogin-1, no entanto, parecem ocorrer mesmo antes da presença de perda de peso ou nos estágios iniciais da caquexia do câncer (Brown *et al.*, 2018; da Fonseca *et al.*, 2020; Yuan *et al.*, 2015).

Também foi documentado que em músculos de pacientes com caquexia associada ao câncer, há regulação positiva de proteínas relacionadas à autofagia, contribuindo para o aumento do processo de degradação do músculo esquelético, incluindo a proteína Beclin1 (complexo regulador da autofagia), proteína 5 de autofagia e proteínas associadas a microtúbulos 1A/1B cadeia leve 3B (MAP1LC3B) (Baracos *et al.*, 2018; Johns *et al.*, 2014). Outros fatores de transcrição relacionados à via ubiquitina e às vias de autofagia, como o fator nuclear- κ B (NF- κ B), o transdutor de sinal e ativador de transcrição 3 (STAT3) e a proteína ligante CCAAT/*enhancer-binding*- β (C/EBP β), também estão aumentados em modelos animais (Baracos *et al.*, 2018; da Fonseca *et al.*, 2020).

A principal via de sinalização no crescimento e proliferação celular é a via da proteína quinase alvo da rapamicina em mamífero (*mammalian target of rapamycin* – a mTOR) e apresenta atividade reduzida no contexto da caquexia, contribuindo para baixa atividade de anabolismo muscular. Além disso, uma das suas subunidades, a mTORC1 estimula a síntese de proteínas e lipídios, enquanto suprime vias catabólicas envolvidas na autofagia; assim, quando sua atividade é diminuída, leva à supressão inadequada da autofagia, contribuindo também no aumento da degradação (Yoon, 2017; da Fonseca *et al.*, 2020;). A redução das taxas de síntese de proteínas musculares também pode estar relacionada à redução da AKT (proteína quinase específica de serina/treonina RAC ou proteína quinase B), proteína que pode ativar a mTORC1 e sua redução pode ativar, por intermédio das proteínas da família de fatores de transcrição proteína *Forkhead box O* (FOXO), a transcrição das proteínas a MURF1 e Atrogin 1 e dessa forma contribuir para a diminuição de vias anabólicas e aumento de vias catabólicas. Porém, a atividade muscular da AKT nem sempre é reduzida em todos os modelos de caquexia associada ao câncer ou em pacientes com câncer (Baracos *et al.*, 2018).

Um dos fatores que podem desencadear o processo de perda muscular é a inflamação sistêmica, resultado da constante resposta inflamatória presente na síndrome da caquexia no câncer (Argilés; Busquets; López-Soriano, 2019; Cao *et al.*, 2021).

A inflamação acontece porque as células tumorais podem secretar citocinas e outros fatores inflamatórios, e parte do sistema imunológico inato é ativado em resposta às células tumorais fazendo com que as células imunes também liberem citocinas e quimiocinas. Esses secretomas irão então agir como mediadores inflamatórios da caquexia (Argilés; Busquets; López-Soriano, 2019).

Em revisão sistemática, foram reportadas 31 citocinas diferentes, dentre elas adipocitocinas, em pacientes com câncer e índices de perda de peso corpóreo, sendo que as citocinas mais frequentemente encontradas foram interleucina IL-6, fator de necrose tumoral- α (TNF- α), leptina, IL-8, IL-1 β e interferon- γ (IFN- γ), IL-10, grelina e adiponectina (Paval *et al.*, 2022). Outros estudos também destacaram outras citocinas da família TNF como o indutor de apoptose semelhante ao fator de necrose tumoral e membro da superfamília do receptor de TNF 12A (TWEAK e a TNFSF12), fator inibitório de leucemia (LIF), fator 15 de crescimento/diferenciação (GDF15) e prostaglandina como mediadores pro-inflamatórios importantes secretados durante a caquexia (Argilés; Busquets; López-Soriano, 2019; Baracos *et al.*, 2018). Além disso, a proteína C-reativa (PCR), uma proteína plasmática que serve como indicador de inflamação, apresentou níveis circulantes aumentados em pacientes com caquexia do câncer em comparação com pacientes oncológicos com peso estável e pacientes não portadores de câncer (Taylor; Laperriere; Germain, 2017; Cao *et al.*, 2021).

As citocinas podem agir tanto localmente como sistemicamente, por estarem circulantes. Foi verificado que grande parte delas apresentam efeitos catabólicos, pois podem ativar fatores de transcrição associados às vias de degradação proteica, além de modularem controles homeostáticos no sistema nervoso central, desencadeando saídas neurais catabólicas via sistema nervoso simpático, bem como saídas neuroendócrinas que também atuam nos órgãos-alvo, principalmente no músculo esquelético, tecido adiposo e músculo cardíaco (Figura 1, adaptada de Baracos *et al.*, 2018) (Argilés, López-Soriano, Busquets, 2012; Argilés *et al.*, 2019; Baracos *et al.*, 2018; da Fonseca *et al.*, 2020)..

Como mostrado na Figura 1, além das citocinas inflamatórias, fatores derivados diretamente do tumor, conhecidos como secretoma complexo de tumores, incluem outras moléculas que também estão envolvidos no processo da caquexia do câncer, podendo provocar efeito direto no catabolismo nos tecidos-alvo, incluindo a proteína de choque térmico (HSP),

activinas, miostatina, serotonina, proteína relacionada ao hormônio da paratireóide, microRNAs, TGF β , adrenomedulina, fator de mobilização de lipídios (LMF), fator indutor de proteólise (PIF), e o toxohormônio L (Baracos *et al.*, 2018; Argilés *et al.*, 2019).

Além das citocinas liberadas pelas células imunes e do secretoma complexo de tumores, outros tipos celulares, como adipócitos, células intestinais, hepatócitos e cardiomiócitos, também liberam peptídeos, que medeiam eventos interórgãos influenciando a ingestão de alimentos ou homeostase energética (Argilés, Busquets, López-Soriano, 2019).

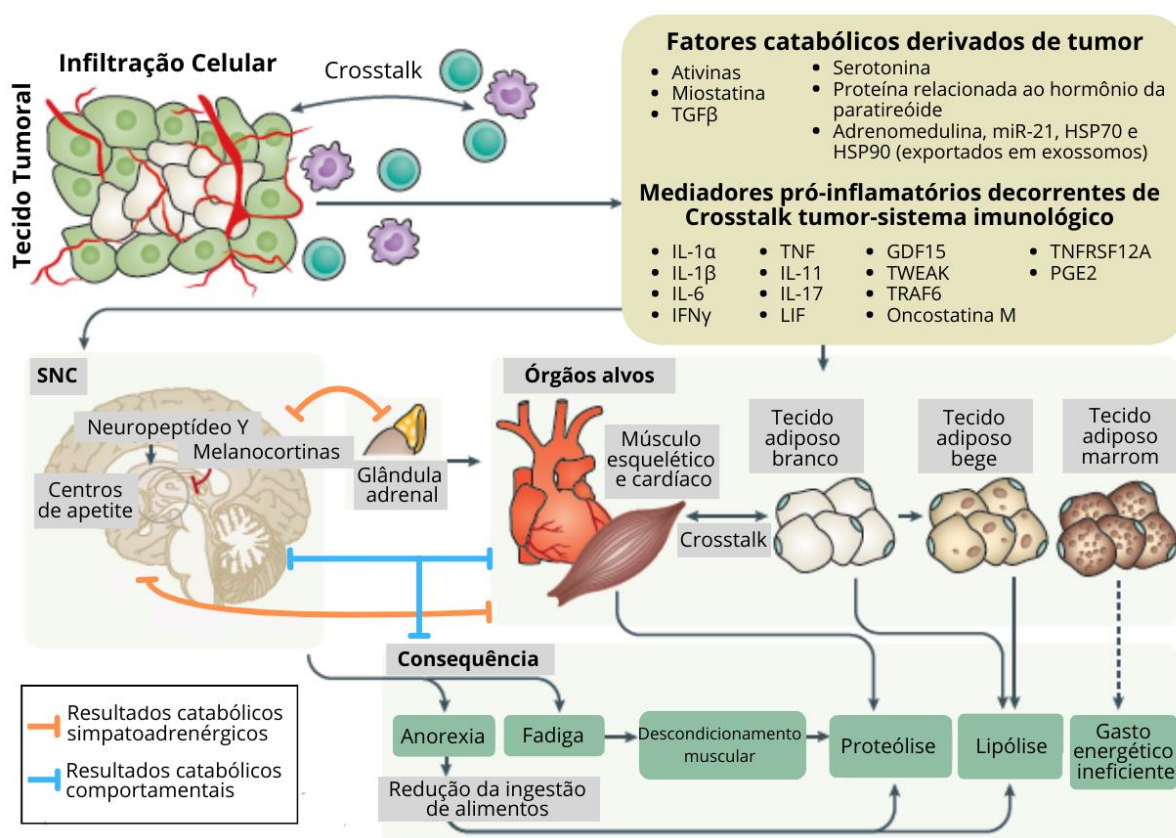


Figura 1. Efeito *Crosstalk* entre tumor, células estromais e sistema imunológico, produzindo fatores que atingem diferentes órgãos e tecidos e sistema nervoso central, causando efeitos catabólicos. Esquema adaptado a partir da figura extraída do artigo “*Cancer-associated cachexia*” de Baracos et al, 2018. A figura mostra que tanto os fatores catabólicos derivados do Tumor - Activinas, Miostatina, TGF β , Serotonina, Proteína relacionada ao hormônio da paratireóide, Adrenomedulina, miR-21, HSP70 e HSP90) - quanto os Mediadores pró-inflamatórios decorrentes de *Crosstalk* tumor-sistema imunológico - citocinas (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IFN γ , TNF, IL-11, IL-17), fator inibitório de leucemia (LIF), fator de crescimento/diferenciação 15 (GDF15), indutor fraco de apoptose relacionado ao TNF (TWEAK), fator 6 associado ao receptor de TNF (TRAF6), Oncostatina M, membro da superfamília do receptor de TNF 12A (TNFRSF12A) e prostaglandina E2 (PGE2), afetam diretamente os tecidos-alvos (coração, músculo esquelético e tecido adiposo) ou de forma indireta por meio de alterações no Sistema Nervoso Central (CNS) que atuam no gasto energético e na redução da ingestão de alimentos. (Figura adaptada de Baracos et al, 2018).

Então, atualmente é conhecido que a caquexia é um distúrbio multifatorial e sistêmico, que além de afetar o músculo esquelético, também envolvem múltiplos órgãos, incluindo tecido adiposo, osso, cérebro, fígado, trato gastrointestinal, rim, pulmão e o coração, sendo a

ocorrência de alterações cardíacas em pacientes com câncer denominada como “caquexia cardíaca” e, infelizmente, é frequentemente subestimada e pouco estudada (Argilés *et al.*, 2019; Schmidt *et al.*, 2018).

2.4. Caquexia Cardíaca

Clinicamente, o termo "caquexia cardíaca" refere-se à perda de peso corpóreo não intencional causada por doenças cardíacas. Entretanto, no contexto do câncer, a caquexia cardíaca descreve a atrofia, remodelação e disfunção cardíaca associadas à esta enfermidade (Murphy, 2016). Embora a principal causa de morte no câncer seja a progressão do próprio câncer, a doença cardíaca é uma importante causa não oncológica de morte nesses pacientes (Totzeck *et al.*, 2019; Anker *et al.*, 2021).

Estudos conduzidos em pacientes com diferentes tipos de câncer encontraram aumento na incidência de insuficiência cardiovascular, diminuição da variabilidade e aumento da frequência cardíaca em repouso, fibrilação atrial, menor volume sistólico, diminuição do peso do coração e diminuição da massa ventricular esquerda associada ao aumento da mortalidade no câncer (Guzzetti *et al.*, 2008; Guo *et al.*, 2015; Barkhudaryan *et al.*, 2017; Seviiri *et al.*, 2018; Lena *et al.*, 2023). Estudos mostram que a caquexia cardíaca do câncer pode evoluir para o quadro clínico de insuficiência cardíaca (IC), sendo comum a coexistência dos dois diagnósticos. Além disso, ambas as doenças compartilham vias mecanicistas comum. Entre elas, podemos destacar a inflamação como o potencial elo entre o câncer e a IC (Boer *et al.*, 2020; Anker *et al.*, 2021). As interleucinas IL-1 β , IL-6 e IL-8, que estão aumentadas em diversos tipos de câncer como mencionado anteriormente, também são encontradas em níveis elevados na circulação de paciente com IC crônica e aguda descompensadas (Boer *et al.*, 2020). Curiosamente, Boer e colaboradores também mostraram que a IC também pode ser uma das causas do câncer (Boer *et al.*, 2020). Assim, em seu estudo, Boer e colegas apontam que níveis elevados de citocinas podem promover transformação e indução de células já inicializadas ao processo de malignização; a reprogramação metabólica para a adaptação ao estresse, na insuficiência cardíaca, pode induzir a inicialização do processo de carcinogênese; a neovascularização tanto para o crescimento tumoral, quanto para a adaptação à sobrecarga cardiovascular, pode contribuir para a progressão de ambas as patologias; e por fim fatores secretados pelo próprio tecido cardíaco em falência, como fatores pro-oncogênicos, que podem proporcionar o crescimento e progressão de tumores (Boer *et al.*, 2020).

No entanto, em pacientes oncológicos, a caquexia cardíaca pode ser devido ao próprio câncer e às doenças cardíacas adjacentes, além dos tratamentos tanto do câncer quanto de outras doenças cardiovasculares concomitantes. É bem conhecido que as medidas terapêuticas oncológicas modernas frequentemente incorporam múltiplos agentes cujos efeitos cardíacos deletérios podem ser aditivos ou sinérgicos aos efeitos dos próprios processos malignos do tumor (Ewer 2015; Lena *et al.*, 2023). A incidência de cardiotoxicidade difere entre os agentes e é considerada subnotificada, mas pode ocorrer em >20% dos pacientes tratados com fluorouracil, doxorrubicina ou daunorrubicina. Entre os agentes quimioterápicos mais bem compreendidos, estudados e usados na clínica, para o tratamento de diversos tipos de tumor, está o grupo das antraciclinas, que inclui o fármaco mais amplamente utilizado, a doxorrubicina. Entre os efeitos causados por estes quimioterápicos podemos citar a redução da contratilidade cardíaca, arritmias, isquemia, infarto, danos às válvulas cardíacas, ao sistema de condução ou ao pericárdio, disfunção sistólica e sinais associados à insuficiência cardíaca, como taquicardia e galope S3, podendo variar de intensidade de acordo com a dose (Ewer, 2015; Murphy, 2016). Estudo realizado com pacientes com câncer de mama, submetidas ao tratamento com antraciclinas, mostrou que o fármaco pode reduzir significativamente a fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE) e a massa do ventrículo esquerdo podendo estar associada à atrofia dos cardiomiócitos acompanhada do aumento de troponina T (Ferreira de Souza *et al.*, 2018). Além dos quimioterápicos e outras terapias, a radioterapia também é bem conhecida por causar efeitos adversos no coração, mesmo em baixas doses (Boerma *et al.*, 2016; Ewer, 2015).

A dificuldade na realização de ensaios clínicos sobre caquexia cardíaca e câncer encontra-se principalmente associada ao fato de que as terapias antineoplásicas também afetam a função cardíaca, porém, outra limitação que envolve questões éticas é o fato de que estudos em humanos não é possível avaliar os biomarcadores cardíacos específicos, como é possível em estudos animais, *in vivo*, ou em células. Sendo assim, os poucos estudos clínicos na área foram retrospectivos e observacionais, onde avaliou-se principalmente a função cardíaca e sintomas do paciente (Ewer 2015; Bagnall *et al.*, 2023). No entanto, a maior parte das informações sobre a patogênese e eficácia dos tratamentos potenciais tem origem em modelos pré-clínicos (Murphy, 2016). Levando em consideração que o mecanismo das alterações cardíacas como consequência do câncer ainda não está completamente elucidado, os experimentos em modelos animais e *in vitro* são essenciais para melhor compreensão dos mecanismos, para então podermos desenvolver estratégias terapêuticas (Boer *et al.*, 2020).

Em diferentes modelos experimentais de caquexia, foi evidenciada redução no peso do coração e diminuição na espessura da parede ventricular, na fração de ejeção cardíaca e na contratilidade ventricular (Springer *et al.*, 2014; Borges *et al.*, 2014; Toneto *et al.*, 2016; Karekar *et al.*, 2021). O tamanho do coração dos animais portadores de tumor é regido pelas taxas relativas de síntese e degradação de proteínas. De maneira similar à que ocorre no músculo esquelético, a degradação das proteínas cardíacas é promovida pelas vias ubiquitina-proteassoma e pelas vias autofagia-lisossomal e dependente de cálcio (Attaix *et al.*, 1998; Costelli *et al.*, 2001; Cospér e Leinwand 2011; Hinch *et al.*, 2013; Borges *et al.*, 2014; Musolino *et al.*, 2016; Sandri, 2016), em contrapartida, a reduzida síntese de proteínas também está associada à diminuição da fosforilação da mTOR (Manne *et al.*, 2013). Porém, estudo de revisão recente mostrou que existem pequenas diferenças, mas importante de serem consideradas, entre o músculo esquelético e cardíaco. No coração caquético, as vias de autofagia-lisossomal demonstram estar mais ativas, por exemplo a Beclin1 e LC3, que são marcadores autofágicos, estão aumentadas e demonstram ser uma das principais responsáveis pelo processo de degradação, porém ao contrário do músculo esquelético, a via ubiquitina-proteassoma ainda não está bem elucidada, mas há indícios de que está menos ativa no tecido cardíaco, estando mais relacionada à função basal. Outra diferença é que a taxa metabólica e renovação de proteínas é potencialmente mais alta no coração (Rausch *et al.*, 2021). Além disso, é interessante mencionar que dentre os muitos genes que regulam ambos os tecidos, alguns afetam apenas o músculo cardíaco e outros apenas o esquelético, mais genes afetam o músculo esquelético do que o miocárdio, e muito poucos dos mesmos genes regulam ambos os tipos de músculo e curiosamente, alguns genes regularam positivamente o coração caquético, mas regularam negativamente os músculos esqueléticos, e vice-versa (Shum *et al.*, 2015; Bagnall *et al.*, 2023).

A Figura 2 mostra a frequência de biomarcadores cardíacos regulados positivamente ou negativamente envolvidos na caquexia cardíaca, induzida por câncer, encontrados em pesquisas animal, porém ainda não confirmados em humanos. Os biomarcadores regulados positivamente e mais frequentes foram a Atrogina, IL-6, TNF- α e MuRF1 em tecido cardíaco de estudos pré-clínicos, sendo camundongos portadores do carcinoma C26, os animais mais frequentemente utilizados (Bagnall *et al.*, 2023).

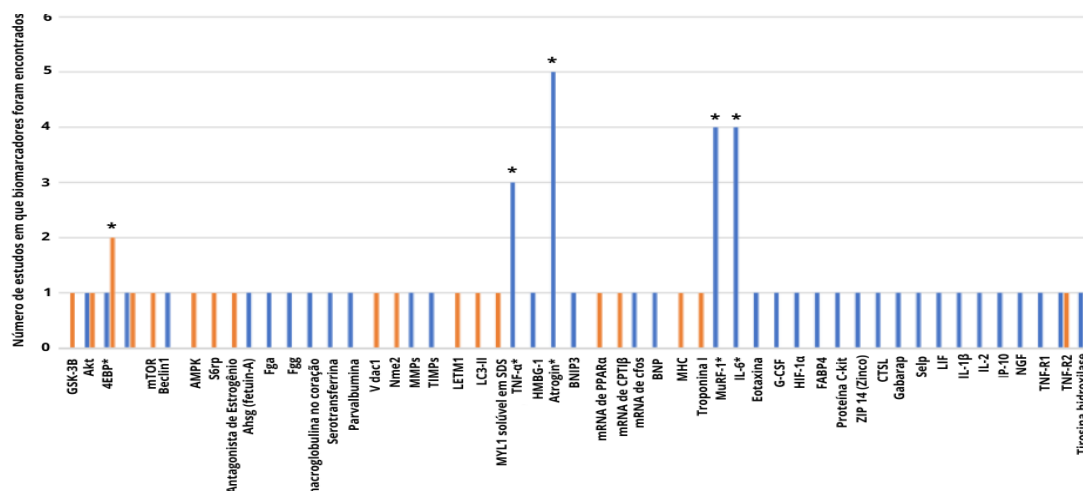


Figura 2. Biomarcadores chave para a caquexia cardíaca do câncer. Esquema adaptado a partir da figura extraída do artigo “Biomarkers and mechanisms associated with cancer-induced cardiac cachexia: A systematic review” do Bagnall *et al.*, 2023. A Imagem mostra a frequência de biomarcadores cardíacos regulados positivamente (azul) e regulados negativamente (laranja) envolvidos na caquexia cardíaca induzida por câncer em modelos animais. Os biomarcadores são expressos na seguinte sequência: 1= GSK-3B, 2= Akt, 3= 4EBP*, 5= mTOR, 6= Beclin1, 7= AMPK, 8= S6rp, 9= Antagonista de Estrogênio, 10= Ahsg (fetuin-A), 11= Fibrinogênio em soleus (fga), 12= Coração (fgg), 13= α-1-macroglobulina no coração, 14= Serotransferrina, 15= Parvalbumina, 16= V dac1, 17= Nme2, 18= Metaloproteínas da matriz (MMPs), 19= Inibidores de metaloproteínas da matriz (TIMPs), 20= LETMI, 21= LC3-II, 22= Cadeia leve 1 de miosina (MYL1) solúvel em SDS, 23= TNF-α*, 24= HMG-1, 25= Atrogin (MAfbx)*, 26= BNIP3, 27= mRNA de PPARα, 28= mRNA de CPT1β, 29= mRNA de cfo, 30= BNP, 31= MHC, 32= Troponina I, 33= MuRF-1*, 34= IL-6*, 35= Eotaxina, 36= G-CSF, 37= HIF-1α, 38= FABPA, 39= Proteína C-kit, 40= ZIP 14 (Zinco), 41= CTSL, 42= Gabarapl, 43= Selp, 44= LIF, 45= IL1β, 46= IL2, 47= IP-10, 48= Fator de crescimento nervoso (NGF), 49= TNF-R1, 50= TNF-R2, 51= Tirosina hidroxilase. * indica os biomarcadores mais frequentemente alterados. (Figura adaptada de Bagnall *et al.*, 2023).

Em termos de caquexia cardíaca é importante ressaltar que o efeito do câncer não causa apenas a atrofia do músculo cardíaco, mas também acomete a função cardíaca que também aumenta a gravidade da caquexia à nível sistêmico, causando um ciclo vicioso. Sendo assim, algumas deficiências funcionais acabam ficando subjacentes, como por exemplo há decrescimento da contratilidade associado à lentidão do relaxamento do miocárdio. Em camundongos portadores de tumor C26, há provavelmente alteração do potencial de ação no miocárdio, com diminuição do influxo e da liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático, gerando assim aumento significativo no tempo de alcance do pico do cálcio e formação do platô, levando consequentemente à menor disponibilidade de cálcio para o processo de contração. Em paralelo, há também maior tempo na repolarização rápida, em função do maior tempo de decaimento desse pico do cálcio, à 50% da sua concentração, em função da menor taxa de reabsorção pelo retículo sarcoplasmático, consequentemente aumentando o tempo de relaxamento (Law & Metzger, 2021). Fica evidente, assim, que a diminuição do cálcio durante a contração e lenta remoção do cálcio durante o relaxamento são fatores que acometem significativamente os processos de contração e relaxamento do coração, como verificado recentemente em modelo pré-clínico (Law & Metzger, 2021).

Como mencionado anteriormente, o aumento nos níveis de citocinas inflamatórias séricas, devido a característica inflamação sistêmica no quadro de caquexia do câncer, pode ativar as vias de degradação proteica no músculo cardíaco, além de induzir também à outras alterações funcionais (Baracos *et al.*, 2018; Murphy, 2016). Em camundongos portadores de tumor C26, o aumento na expressão de interleucina 6 (IL-6) está em associação com alterações na cadeia pesada de miosina (MHC), troponina I e nas proteínas responsáveis pelo transporte de glicose (GLUT), com mudança nas isoformas adultas (MHC α , GLUT4) para isoformas fetais (MHC β , GLUT1), evidenciando reativação do padrão de expressão gênica fetal (Tian *et al.*, 2010, 2011). Corroborando estas informações, outro estudo mostrou que os genes fetais ANP (atrial natriuretic peptide), BNP (brain natriuretic peptide) e MHC β estavam superexpressos em animais portadores de tumor C26 (Mishra *et al.*, 2018). A ativação dos genes fetais caracteriza-se como marcador da modulação cardíaca, amplamente observado durante a insuficiência cardíaca (Depre *et al.*, 1998), evidenciando que a caquexia cardíaca pode acarretar a insuficiência cardíaca. Há evidências de que no músculo cardíaco atrofiado, em decorrência da caquexia cardíaca, ocorre diminuição e desarranjo das proteínas sarcoméricas com maior desestruturação das proteínas do disco Z e da linha M (Cospers & Leinwand, 2011; Shum *et al.*, 2018), indicando que as alterações no citoesqueleto podem ser um dos fatores que comprometem a contratilidade ventricular.

Também foi observado o comprometimento mitocondrial no tecido cardíaco de animais portadores de tumor, evidenciados pelas alterações morfológicas e fragmentação da mitocôndria e redução de complexos da proteína OXPHOS (*oxidative phosphorylation*), acompanhada da diminuição da função cardíaca, espessura da parede ventricular e síntese proteica em camundongos machos (Shum *et al.*, 2018; Berent *et al.*, 2019). A disfunção mitocondrial é frequentemente associada ao aumento de espécies reativas ao oxigênio (EROs), e estudos recentes vem mostrando a ocorrência desse aumento em modelos experimentais de caquexia cardíaca do câncer, além disso, é importante considerar que as mitocôndrias são especialmente abundantes no tecido cardíaco e que há evidências de fortes conexões entre EROs mitocondriais e doenças cardíacas (Karekar *et al.*, 2021; Lee *et al.*, 2021; Peoples *et al.*, 2019).

Alguns estudos desenvolveram, em paralelo aos experimentos animais, experimentos *in vitro* a fim de investigar vias que pode ser mais bem explorada em análises celulares, como por exemplo vias relacionadas ao metabolismo e função mitocondrial. Apesar da importância, na área da caquexia cardíaca do câncer, esses estudos ainda são escassos e os modelos

experimentais são diversos. Na Tabela 1, pode-se observar os dados *in vitro* de estudos encontrados desenvolvidos em paralelo à estudos *in vivo*. Nesses estudos há descrição de qual a linha celular, se houve diferenciação em cardiomiócitos ou não, além de descrevem a forma de indução dos danos cardíacos a fim de mimetizar os processos de caquexia cardíaca em humanos e em estudos pré-clínicos. A Tabela 1 descreve, ainda de forma sucinta, as principais alterações observadas nessas células expostas aos diferentes processos.

Pode-se notar que a forma de mimetizar a caquexia cardíaca *in vitro*, variam entre os estudos. De acordo com a Tabela 1, dois estudos utilizaram o meio condicionado (MC) que consiste na obtenção do meio de cultura proveniente do crescimento de células tumorais; neste modelo, as respostas advêm dos fatores indutores de caquexia liberados pelo próprio tumor, porém, a limitação é que não considera as respostas globais do hospedeiro que incluem fatores inflamatórios sistêmico (Berent *et al.*, 2019; Lee *et al.*, 2021). Outra proposta foi induzir os danos cardíacos com fatores específicos como as citocinas, avaliando o efeito isolado de cada uma delas, a fim de analisar o possível efeito da inflamação sistêmica no tecido cardíaco (Buoncervello *et al.*, 2019). Ainda, como uma terceira proposta, foi utilizado o líquido ascítico, neste caso, podemos considerar que induz de maneira mais aproximada do que acontece nos animais, pois o líquido ascítico contém todos os fatores circulantes sistêmicos nos animais (Nukaga *et al.*, 2020).

Há também variação no modelo tumoral e nas linhas celulares. Dos estudos que não utilizaram citocinas, dois deles utilizaram o modelo de Tumor de Lewis, que é um modelo de carcinoma pulmonar em camundongos, e outro estudo utilizou o modelo C26, que é um modelo de câncer de colo, também em camundongo, ambos frequentemente utilizados em estudos da caquexia do câncer. Mais amplamente utilizada em estudos sobre doenças cardiovasculares, as células H9c2 é um subclone da linha celular clonal original derivada do tecido cardíaco embrionário de rato BD1X (ATCC); apresentam rápida propagação em cultura e resposta homogênea a estímulos, o que permite seu uso em experimentos que envolvem a modelagem de várias doenças e alterações cardiovasculares. No entanto, as células H9c2 apresentam algumas limitações, incluindo a capacidade de divisão celular, perda de características cardíacas específicas e resistência à lesão hipóxica, o que pode ter impacto significativo na extrapolação dos resultados *in vitro* para os mecanismos *in vivo*. Para eliminar essas desvantagens, a diferenciação dessas células pode ser induzida, de forma que elas apresentem fenótipo cardíaco mais maduro (Branco *et al.*, 2015; Zevolis *et al.*, 2022).

Tabela 1. Modelos *in vitro* que avaliam possíveis efeitos que mimetizam a caquexia cardíaca em vias mitocondriais

Linha celular	Indução de danos cardíacos	Principais achados	Referência
H9c2 diferenciadas	Citocinas inflamatórias: TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-8 e IL-1 β (separadamente) Exposição: 50 ng/ml por 48h	- Alteração no potencial da membrana mitocondrial - Aumento na produção de EROs - Alteração nos elementos citoesqueléticos contráteis (profunda alteração na organização da actina/miosina)	Buoncervello <i>et al.</i> , 2019
AC16 (tratados após a confluência)	MC LLC1 (Carcinoma pulmonar de Lewis - camundongo) 24h Exposição: 25% por 24h	- Prejuízo na captação mitocondrial de oxigênio - Prejuízo na taxa de consumo mínimo de oxigênio - Prejuízo na capacidade de reserva mitocondrial e respiração máxima	Berent <i>et al.</i> , 2019
H9c2 não diferenciadas	Ascite de camundongos com caquexia induzida por CT26 (câncer de colo) Exposição: 20%	- Estresse oxidativo aumentado - Diminuição da respiração mitocondrial - Diminuição na produção de ATP	Nukaga <i>et al.</i> , 2020
H9c2 não diferenciadas	MC LLC (Carcinoma pulmonar de Lewis - camundongo) 2 dias Exposição: 25% por 24h	- Maior produção de EROs (25%) - Menores taxas de consumo de oxigênio (10% no basal e 75% no máximo) - Maior suscetibilidade à hipóxia (~25%) - revertida pelo MitoTempo.	Lee <i>et al.</i> , 2021
H9c2 não diferenciadas	Ascite de ratos com câncer de cólon RCN9 Exposição: 25%	- Redução do volume mitocondrial - Aumento do estresse oxidativo - Diminuição do potencial de membrana - Aumento da apoptose e autofagia.	Goto <i>et al.</i> , 2024

Independente do modelo utilizado, todos os estudos encontraram alteração na via mitocondrial, afetada pela produção de EROs e estresse oxidativo, resultados que corroboram e complementam algumas das análises *in vivo* em que foi encontrado alterações das vias mitocondriais como a diminuição das proteínas OXPHOS (Berent *et al.*, 2019; Lee *et al.*, 2021; Goto *et al.*, 2024). Buoncervello e colaboradores, também, encontraram alterações de elementos citoesqueléticos contráteis devido à profunda desorganização da actina/ miosina, nas células expostas às citocinas, indicando que a inflamação sistêmica associada ao crescimento

do câncer pode causar alterações nas mitocôndrias e no sistema de microfilamentos de cardiomiócitos (Buoncervello *et al.*, 2019).

Contudo, é importante considerar que diferentes tipos de tumor apresentam respostas distintas quanto a intensidade do efeito ou atuação sobre uma ou outra proteína específica, entretanto, os estudos necessitam também ampliar as análises aos outros modelos experimentais. Como mencionado anteriormente, ainda temos poucos estudos sobre a caquexia cardíaca no câncer, e sabe-se menos ainda como as alterações cardíacas ocorrem no modelo de Tumor de Walker-256, que é um modelo originalmente identificado como adenocarcinoma mamário em ratas e amplamente utilizado como indutor da síndrome da caquexia associada ao câncer (Emery, 1999; Penna *et al.*, 2016). Nesse modelo têm-se a presença do Fator Walker (FW), proteína análoga ao PIF, liberada pelo tumor e que induz proteólise nos tecidos (Gonçalves *et al.*, 2013; Yano *et al.*, 2008).

2.5. Estratégia Terapêutica na Caquexia Cardíaca: A Leucina como uma possibilidade co-adjuvante

Consensualmente, a caquexia e a função cardíaca diminuída não podem ser totalmente revertidas pelo suporte e aumento nutricional convencional (Tian *et al.*, 2010; Fearon *et al.*, 2011) e o tratamento precoce, antes que as alterações clínicas sejam observadas, pode melhorar a função cardíaca e levar à melhores resultados para os pacientes (Bagnall *et al.*, 2023). Por isso, algumas estratégias nutricionais específicas vêm sendo utilizadas como alternativa para atenuar os efeitos da síndrome da caquexia, com a intenção de melhorar a qualidade e sobrevida dos pacientes com câncer, porém, a maioria das estratégias focam basicamente na melhora da musculatura esquelética (de acordo com Protocolos Clínicos e Diretrizes Terapêuticas – PCDT, do Ministério da Saúde, Brasil).

A leucina é um dos três aminoácidos essenciais de cadeia ramificada, que demonstra participar de processos regulatórios no músculo esquelético, como sinalização celular para a manutenção da síntese de proteínas musculares, e para redução da proteólise e apoptose, como a diminuição da atividade da via ubiquitina-proteassoma e das enzimas quimotripsina e catepsina, por isso vem sendo amplamente estudada na prevenção e tratamento da espoliação muscular. Esses efeitos foram verificados tanto em ensaios *in vitro*, em células C₂C₁₂, quanto em ratos caquéticos portadores de tumor de Walker-256 (Ventrucci *et al.*, 2004; Gonçalves *et al.*, 2013; Cruz *et al.*, 2017). Desse modo, a suplementação nutricional com leucina também favoreceu a biogênese mitocondrial e melhorou a taxa de consumo de oxigênio indicando

melhora da atividade mitocondrial, mantendo a atividade de produção de energia no tecido muscular esquelético (Cruz *et al.*, 2020). Além disso, um dos estudos demonstrou que a dieta rica em leucina também modulou citocinas pró-inflamatórias presentes no soro de ratos caquéticos portadores de tumor (Cruz *et al.*, 2017).

No entanto, em relação ao tecido cardíaco no contexto de caquexia do câncer, na literatura pertinente, pouco se sabe sobre a ação da leucina. Estudo realizado no nosso Laboratório de Nutrição e Câncer mostrou que a dieta rica neste aminoácido melhorou parâmetros funcionais cardíacos, com redução do risco de morte súbita em ratos portadores de tumor, observada pela modulação de ECG e diminuição do aumento de biomarcadores de insuficiência cardíaca (MPO, TIMP-1 e PAI-1), das atividades da fosfatase alcalina e da quimotripsina (Toneto *et al.*, 2016), mas não se sabe em quais vias específicas a leucina pode ter atuado, como ser capaz de atuar a nível mitocondrial e estrutural, por exemplo.

Considerando as diferentes dinâmicas e respostas entre os tecidos afetados pela caquexia do câncer, mas também que a leucina apresenta efeitos benéficos em diversas vias alteradas no músculo esquelético, melhor compreensão do tecido cardíaco é necessário, tanto para entender como a leucina pode influenciar a resposta no mesmo, quanto para pensar em outras estratégias considerando vias específicas que podem ter maior influência no coração.

3. Justificativa

A caquexia cardíaca ocorre em grande parte dos pacientes oncológicos devido ao próprio processo da evolução do tumor, que faz com que os pacientes possam desenvolver a síndrome da caquexia. Esta síndrome afeta diversos órgãos e tecidos, porém cada um deles apresentam características particulares e podem responder de maneira diferentes aos mesmos estímulos.

A leucina vem sendo amplamente estudada no tratamento e prevenção da espoliação do músculo esquelético caquético, e também atenuou algumas alterações cardíacas em ratos com tumor, porém os mecanismos de como o tecido cardíaco é afetado não estão bem elucidados. Por isso, para tratamentos eficazes que visam o paciente como um todo, é importante a melhor compreensão dos mecanismos do tecido cardíaco no contexto do câncer a fim de desenvolver estratégias terapêuticas que também sejam eficazes para o coração caquético.

4. Objetivos

Tendo em vista as alterações celulares envolvidas na caquexia cardíaca associada ao câncer, este trabalho teve como principal objetivo mimetizar esse processo em modelo *in vitro*, para analisar os efeitos da evolução tumoral sobre as células musculares cardíacas H9c2, assim como o papel da suplementação com leucina, como tratamento coadjuvante, quanto à modulação dos danos produzidos pelo tumor. Para tal, mimetizamos a caquexia cardíaca através de duas propostas de modelos experimentais *in vitro*, utilizando, na primeira proposta, o líquido ascítico proveniente de animais com tumor e, na segunda proposta, o soro de animais caquéticos, portadores do tumor de Walker-256, modelo experimental de caquexia. O líquido ascítico inativado foi avaliado quanto a contraprova negativa.

5. Objetivos específicos:

Devido aos efeitos dos fatores tumorais e fatores produzidos pelo sistema imunológico, como as citocinas pró e anti-inflamatórias presentes no líquido ascítico ou o soro de ratos caquéticos portadores de tumor de Walker-256:

- Avaliamos citocinas pró e anti-inflamatórias presentes no soro de ratos caquéticos portadores de Tumor de Walker-256 comparando com o soro de ratos saudáveis; assim como presentes no líquido ascítico e no líquido ascítico inativado de ratos portadores de tumor de Walker-256, a fim de avaliar o efeito indireto da evolução tumoral.

- Avaliamos o perfil metabolômico do líquido ascítico e do líquido ascítico inativado de ratos portadores de tumor de Walker-256 a fim de avaliar o efeito da inativação sobre a concentração dos metabólitos.

- Analisamos a resposta das células H9c2 expostas ao líquido ascítico quanto à viabilidade, respiração celular, expressão de proteínas mitocondriais e relacionadas a autofagia, além da sua influência sobre a principal proteína chave de células cardíacas.

- Avaliamos as respostas das células H9c2 diferenciadas expostas ao soro de ratos caquéticos e à leucina, quanto à sua viabilidade, respiração celular, proteínas do cito esqueleto, em função dos efeitos deletérios do estado caquético e modulatórios da suplementação nutricional.

6. Materiais e Métodos

6.1. Modelos experimentais

No presente trabalho buscamos entender melhor como o carcinossarcoma de Walker-256 pode afetar as células cardíacas a partir de dois modelos experimentais *in vitro*, o primeiro utilizando o líquido ascítico proveniente do tumor de Walker-256 em células H9c2 não diferenciadas (Modelo experimental I) (Figura 3), e o segundo utilizando o soro de ratos caquéticos portadores de Tumor de Walker-256 em células H9c2 diferenciadas e tratados com Leucina (Modelo experimental II) (Figura 4).

6.2. Modelo experimental I

O primeiro modelo, conforme descrito esquematicamente na Figura 3, foi estabelecido com o principal objetivo de analisar os possíveis efeitos deletérios dos fatores tumorais em células cardíacas. Esta proposta, com a utilização de células cardíacas, foi pioneira no Laboratório de Nutrição e Câncer, então, para as primeiras análises foram utilizados cardiomioblastos, modelo de cultivo mais rápido, a fim de se obter uma resposta mais abrangente e exploratória para o direcionamento de análises futuras. Para a mimetização do tumor neste modelo, foi escolhido o líquido ascítico, que vinha sendo estudado pelo grupo e utilizado para o isolamento do Fator Walker, proteína, imunologicamente análoga ao PIF (fator indutor de proteólise). Como contraprova negativa para o líquido ascítico, o mesmo foi inativado (por aquecimento e desnaturação de proteínas).

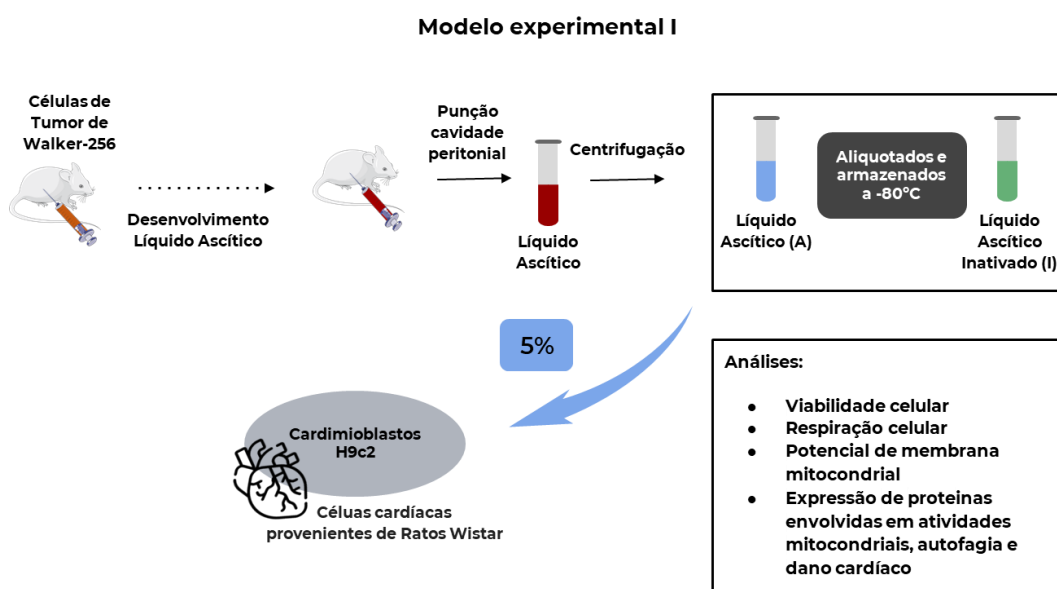


Figura 3. Modelo experimental I. Esquema representativo Modelo experimental I com células H9c2, não diferenciadas, expostas ao líquido ascítico, proveniente de ratos portadores do tumor de Walker-256, tumor implantado na região intraperitoneal para obtenção do líquido ascítico, o qual também foi inativado por aquecimento e desnaturação de proteínas. Para esse modelo foram desenvolvidos experimentos isolados para obtenção de amostras para análises dos efeitos deletérios induzidos pelo tumor.

6.3. Modelo experimental II

O segundo modelo experimental, descrito na Figura 4, foi estabelecido devido a algumas limitações encontradas no primeiro modelo I (item 6.2). Devido ao fato de que os cardiomioblastos podem apresentar respostas diferentes em relação aos cardiomiócitos (Branco *et al.*, 2011), a diferenciação pode fazer com que a célula apresente características e marcadores mais próximos às dos cardiomiócitos de neonatos (Onódi *et al.*, 2022), sendo esta a alternativa utilizada em cultura primária. Assim, nesse modelo as células cardíacas H9c2 foram diferenciadas para a obtenção de resultados mais robustos e também comparativos, com o modelo I, e também com os modelos *in vivo*. Além disso, pensamos que seria interessante o estabelecimento do grupo controle com menos variações em relação ao grupo que mimetiza a caquexia cardíaca, e que ainda assim, considerássemos as respostas globais em relação à evolução do tumor e também comparativamente ao animal do grupo controle, por isso, a caquexia foi mimetizada utilizando soro de animais caquético, e como grupo controle, foi utilizado o soro de ratos saudáveis. Nesse modelo experimental, também avaliamos os possíveis efeitos modulatórios do tratamento com a leucina.

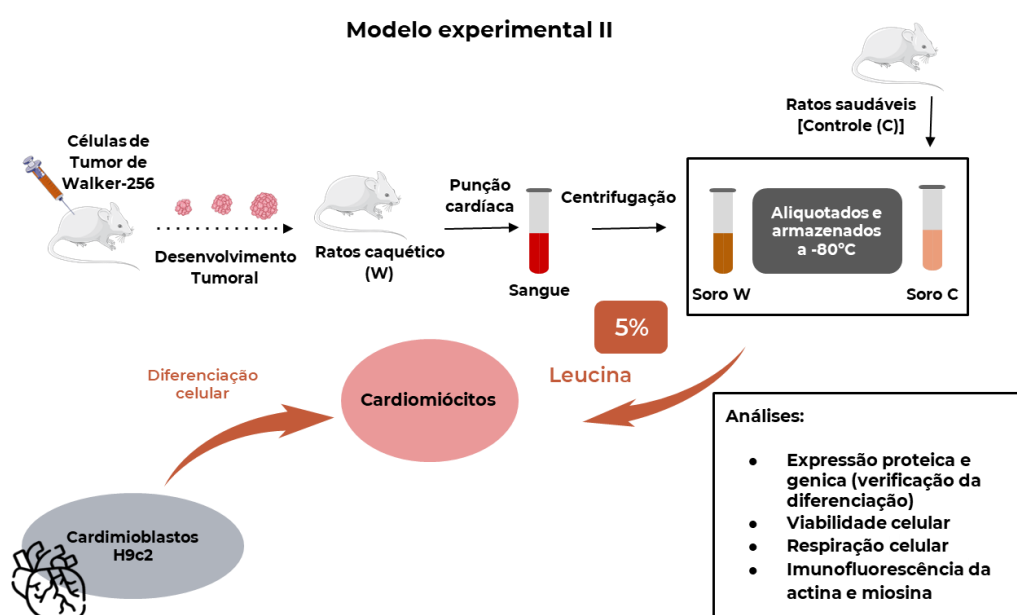


Figura 4. Modelo experimental II. Esquema representativo do modelo experimental II com células H9c2 diferenciadas expostas ao soro de ratos caquéticos como indutor de caquexia e tratamento com leucina, para análise dos efeitos deletérios do tumor associados aos efeitos modulatórios da suplementação.

Assim, uma vez estabelecidos os modelos experimentais, a Figura 5 descreve os diferentes grupos experimentais desenvolvidos para cada um dos modelos.

Para o modelo I foram estabelecidos os seguintes grupos com os diferentes tratamentos (Figura 5A), pelo período de 48h:

C: Controle (cardiomioblastos H9c2, grupo controle),

A: Líquido ascítico mimetizando caquexia (cardiomioblastos H9c2 expostos ao meio de cultura suplementado com 5% de líquido ascítico proveniente de ratos portadores do carcinossarcoma de Walker-256)

I: líquido ascítico inativado (cardiomioblastos H9c2 expostos ao meio de cultura suplementado com 5% de líquido ascítico inativado (Figura 5A).

O modelo II, após a diferenciação celular, estabeleceu-se os seguintes grupos (Figura 5B), com tratamentos pelo período de 48h:

C: Controle (células H9c2 diferenciadas, suplementadas com 5% de soro de ratos saudáveis).

L: Controle Leucina (células H9c2 diferenciadas, suplementadas com 5% de soro de ratos saudáveis, e expostas à suplementação com leucina).

W: Soro de rato Walker mimetizando caquexia (células diferenciadas, suplementadas 5% de ratos caquéticos portadores de tumor de Walker-256).

WL: Soro de rato Walker mimetizando caquexia tratado com leucina (células diferenciadas, suplementadas 5% de ratos caquéticos portadores de tumor de Walker-256 e expostas à suplementação com leucina) (Figura 5B).

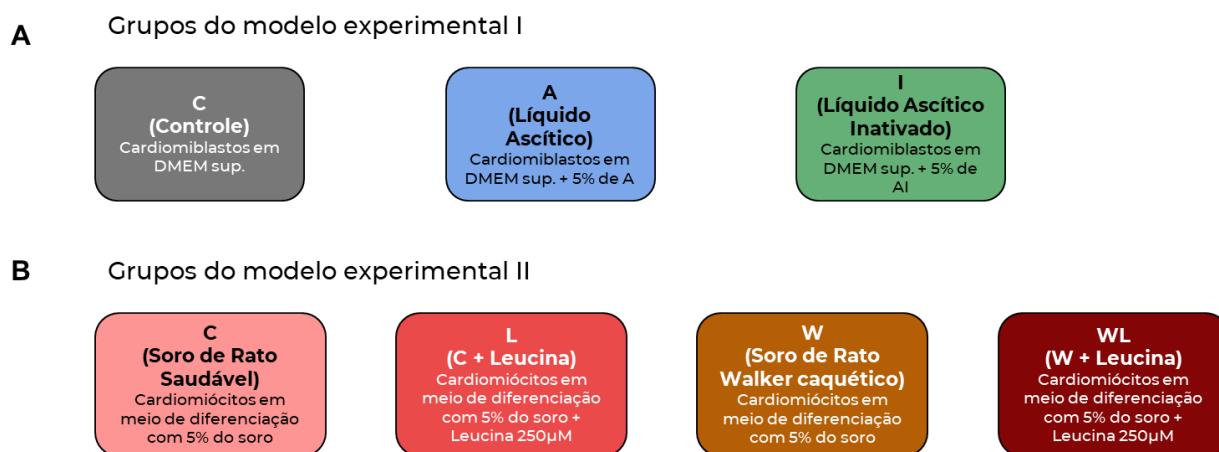


Figura 5. Grupos experimentais obtidos dos dois modelos propostos. Representação dos tratamentos realizados no Modelo experimental I e II. **A: Grupos experimentais do Modelo I** - cardiomioblastos H9c2 tratados ou não com líquido ascítico ou líquido ascítico inativado, perfazendo o controle (C) e expostos à 5% de líquido ascítico (A) e a 5% de líquido ascítico inativado (I) por 48h. **B: Grupos experimentais do Modelo II** - cardiomiócitos H9c2 expostos à 5% de soro de ratos saudáveis (C) e a 5% de soro de ratos caquéticos portadores de tumor de Walker-256 (W), tratados com leucina (L) e expostos ao soro de ratos caquéticos e tratados com leucina (WL) por 48h. Em ambos os modelos os tratamentos foram realizados pelo período de 48h. As cores dos respectivos organogramas representam os grupos, as quais foram as mesmas apresentadas nos diferentes gráficos apresentados nos resultados.

6.4. Obtenção das amostras de líquido ascítico e soro de ratos

Para os dois modelos experimentais propostos foram obtidos líquido ascítico e soro de ratos caquéticos a partir de ratos portadores do tumor de Walker-256.

Ratos machos Wistar adultos foram obtidos no Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório (CEMIB – UNICAMP, protocolo CEUA no. 5828-1-2021). Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, sob condições ambientais controladas (ciclo de claro e escuro 12/12h, temperatura 22 ± 2 °C, umidade 50 – 60%).

Para a obtenção do líquido ascítico, $\approx 3,0 \times 10^6$ de células Walker-256 viáveis (modelo de neoplasia maligna, estabelecido como indutor de caquexia) foram injetadas na cavidade peritoneal dos animais. Após 6 dias, os ratos foram eutanasiados com anestésico isoflurano, e então, o líquido ascítico foi extraído da cavidade peritoneal. Foi realizado pool do montante de líquido ascítico retirado de aproximadamente 6 animais, de forma asséptica, e então centrifugado (3500 rpm, 4 °C, 15 min) e congelado a -80 °C até o momento do uso, seguindo protocolo já estabelecido em nosso Laboratório (Cruz *et al.*, 2016; Gonçalves *et al.*, 2013). Para avaliar a possível interferência de peptídeos/proteínas e fatores humorais presentes no líquido ascítico, parte do mesmo foi inativado, por aquecimento, à 80 °C por 10 min, este ponto está baseado em trabalhos anteriores que verificaram que a inativação do líquido ascítico corresponde à contraprova negativa para o mesmo (Gomes-Marcondes MCC, 1994).

Para a obtenção de soro de animais caquético, as células Walker-256 ($\approx 3,0 \times 10^6$ de células viáveis) foram injetadas no subcutâneo no flanco direito do animal. Como modelo de caquexia, a evolução desse tumor sólido estabelece o estado caquético através dos seguintes parâmetros: os ratos portadores de tumor que apresentaram perda de peso corpóreo $\geq 10\%$ e o peso do tumor $\geq 10\%$ em relação ao peso corpóreo total. Foram considerados também diminuição dos níveis séricos de albumina e proteínas totais, bem como processo inflamatório, através da determinação de citocinas circulantes no soro dos animais. Desse modo, após 21 dias da evolução do tumor, dos animais que apresentaram essas características, o soro foi obtido a partir do sangue coletado, através de punção cardíaca, de ratos caquéticos, portadores do carcinossarcoma de Walker-256 (W), eutanasiados com o anestésico isoflurano. Da mesma forma, com punção cardíaca foi obtido soro de ratos saudáveis (S), que apresentavam a mesma idade e não eram portadores de tumor. O sangue foi manipulado de maneira asséptica, centrifugado imediatamente após a coleta (3500 rpm, 4 °C, 15 min), para a obtenção do soro a ser utilizado nas células, foi realizado pool de cada grupo (S e W) e então foi aliquotado e congelado a -80 °C até o momento do uso.

As diretrizes gerais do Comitê de Coordenação do Reino Unido para Pesquisa do Câncer, 1998 (UKCCCR) (Vale *et al.*, 2005) sobre o bem-estar animal, foram seguidas e o protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê Institucional de Ética em Pesquisa Animal

(Comissão de Ética no Uso de Animais, Instituto de Biologia, CEUA/IB/UNICAMP, protocolo 5828-1/2021, adendo no. 5828-1/2024).

6.5. Manutenção da cultura celular

Células H9c2, correspondentes a mioblastos isolados de músculo cardíaco de rato (*Rattus norvegicus*) foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ), e utilizadas no modelo I, assim como no modelo II (Figuras 3A e 3B). As células foram cultivadas em Meio Dulbecco Modificado por Eagle (DMEM) com alta concentração de glicose (4,5 g/L), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) acrescido com antibióticos (100 U/mL de penicilina e 0,1 mg/mL estreptomicina), piruvato de sódio (1mM) e glutamina (2mM), denominado aqui como DMEM-sup, sob atmosfera de 5% de CO₂, 37°C e 85% de umidade relativa. As células foram utilizadas entre as passagens 17 e 30. Quando as células atingiram ~ 70% de confluência, as células foram recuperadas através da incubação com solução de tripsina durante 3 minutos a 37 °C, e foram novamente cultivadas em frascos de 75 cm².

6.6. Estabelecimento de protocolo de diferenciação celular

Para estabelecer o protocolo de diferenciação das células H9c2 utilizado no modelo experimental II (Figura 3B), algumas variações na densidade de células para o plaqueamento, porcentagem de confluência, tempo prévio ao início da exposição ao meio de diferenciação e tempo de exposição ao meio de diferenciação foram testados e, então, as seguintes padronizações foram escolhidas: As células foram cultivadas em placas de 6, 24 ou 96 poços à densidade inicial de 3×10^4 células/cm², em DMEM-sup, após atingir cerca de 80% de confluência (aproximadamente 48h), a diferenciação foi induzida pela mudança da concentração de 10% do SFB no DMEM-sup para 1% de SFB e adição de ácido retinóico na concentração de 100 nM por 48 horas antes do tratamento. Também nesse modelo experimental II (Figura 3B), para caracterizar melhor a condição de caquexia, foi utilizado o soro de rato caquético e para que pudéssemos ter o controle referência, durante o tratamento, o meio de diferenciação foi mantido, mas com a substituição do SFB por 5% do soro de ratos, caquéticos ou saudáveis.

6.7. Análises bioquímicas e moleculares

6.7.1. Determinação de citocinas pró-inflamatórias no soro e no líquido ascítico e análise metabolômica do líquido ascítico

As citocinas pró-inflamatórias presentes na amostra de líquido ascítico, com e sem inativação, presentes no soro de animais saudáveis e no soro de animais portadores de tumor de

Walker-256, caquéticos, foram determinadas pelo ensaio de imunodeteção através da reação de microesferas, codificadas por cores e acopladas à anticorpos específicos para detecção de múltiplos analitos no soro através do equipamento de Luminex, utilizando-se o painel da R&D Systems (EUA). O ensaio foi executado de acordo com as instruções dos fabricantes com padrões e amostras em duplicatas. Resumidamente as amostras de líquido ascítico, com e sem inativação, de soro de animais saudáveis e do soro de ratos portadores de tumor de Walker-256 foram centrifugadas e diluídas no diluente calibrador RD6-5, foi realizada a diluição da curva padrão, também no diluente calibrador RD6-5, o coquetel de micropartículas e de anticorpos para citocinas IL-10 e IL-1 β , específicas para ratos, foram diluídos nas concentrações indicadas assim como a estreptavidina em *Wash Buffer*. Em placa de 96 poços todas as amostras foram pipetadas em duplicata no volume de 50 μ l por poço, foram adicionados 50 μ l do coquetel de micropartículas devidamente passada pelo vórtex e a placa foi incubada em agitador de placas, temperatura ambiente, por 2 horas. Após a incubação a placa foi lavada 3 vezes com o *Wash Buffer* com o auxílio de placa magnética para lavagem. Após a lavagem, foram adicionados 50 μ l do coquetel de anticorpos sendo incubado em agitação e temperatura ambiente por mais 1 hora. A lavagem foi repetida como descrito anteriormente, e então foram adicionados 50 μ l da solução de estreptavidina e incubadas em agitação, temperatura ambiente, por mais 30 minutos. A lavagem foi novamente repetida, e as micropartículas foram ressuspensas em 100 μ l de *Wash Buffer* e então incubadas por 2 minutos me agitador de placas. A placa foi lida utilizando o equipamento Luminex®.

Para a análise metabolômica, as amostras de líquido ascítico foram filtradas através de coluna Microcon YM-3 (Amicon Ultra 0,5 mL, Sigma-Aldrich) com filtro de membrana de 3 kDa, para centrifugação, e para recuperação do filtrado (a 4 °C). O filtrado (0,3 mL) foi diluído em solução aquosa (0,5 mL) contendo 10% (v/v) de óxido de deutério (D₂O, 99,9%; Cambridge Isotope Laboratories Inc., Massachusetts, EUA), tampão fosfato (0,1 M, pH 7,4) e 0,5 mM de TMSP-d₄ (ácido 3-(trimetilsilil)-2,2',3,3'-tetra deuteropropiônico da Sigma-Aldrich), e então transferido para o tubo de NMR de 5 mm (Norell Standard Series 5 mm, Sigma-Aldrich) para aquisição imediata da leitura dos metabolitos através do espectrometria de massas.

Os espectros de ¹H NMR das amostras foram adquiridos usando o espectrômetro de NMR Varian Inova (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, EUA) equipado com sonda de ressonância tripla e operando à frequência de ressonância de ¹H de 600 MHz e temperatura constante de 298 K (25 °C). O total de 256 decaimentos de indução livre foram coletados com 32 mil pontos de dados ao longo da largura espectral de 16 ppm. Atraso de relaxamento de 1,5s foi incorporado entre as varreduras, durante o qual o campo de frequência de rádio (RF) de pré-

saturação contínuo da água foi aplicado. As correções de fase espectral e de linha de base, bem como a identificação e quantificação dos metabólitos presentes nas amostras, foram realizadas usando o software Chenomx NMR Suite 7.6 (Chenomx Inc., Edmonton, Canadá), seguido de análise dos metabólitos diferentes significativamente, para verificar as vias relacionadas com os metabólitos alterados, utilizando a plataforma Metaboanalyst (<https://www.metaboanalyst.ca/MetaboAnalyst/ModuleView.xhtml>). O equipamento foi utilizado em parceria com o Laboratório Nacional de Biociências (LNBio) no Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM) com o suporte e orientações do Dr Maurício Luís Sforça, responsável pela coordenação do Lab. de Ressonância Magnética Nuclear, onde o equipamento fica localizado.

6.7.2. Ensaio de viabilidade celular

As células H9c2 foram cultivadas em placas de 96 poços em DMEM-sup, na densidade inicial de $6,5 \times 10^3$ células/cm², após 24h, as células foram expostas aos tratamentos, conforme descritos no item 6.2 – para o modelo experimental I (Figuras 3 e 5A), ou para o modelo experimental II, onde as células H9c2 foram plaqueadas e diferenciadas conforme descrito no item 6.6 e tratadas conforme descrito no item 6.3 (Figuras 4 e 5B), além de serem submetidas à curva dose-resposta à leucina.

Para determinar a concentração de leucina a ser utilizada nos tratamentos do modelo experimental II, tendo em vista que o soro de ratos portadores de tumor diminui a viabilidade das células, foi realizada curva de dose-resposta à leucina através do ensaio de viabilidade celular. Para tanto, as células foram cultivadas em placas de 96 poços e diferenciadas, como descrito anteriormente no item 6.6 (Figura 5B). Após a diferenciação, as células foram expostas às diferentes concentrações de Leucina - 100 a 1000 μ M (Sigma) – em meio de tratamento C e W conforme descritos no item 6.3 (Figura 4), e após as 48h, foi realizado o ensaio de viabilidade celular, como descrito abaixo. A escolha das dosagens a serem testadas foram baseadas nas respostas das células C₂C₁₂ em que a concentração de 50 μ M foi o suficiente para modular danos causados pelo FW (Bread *et al.*, 2020). No modelo experimental II, após a diferenciação foram expostas aos tratamentos conforme descritos no item 6.3 (Figura 5B).

Após a exposição aos respectivos tratamentos, o ensaio de viabilidade celular foi realizado através do método com o composto de tetrazólio MTT (brometo de 3- [4, 5-dimetiltiazol-2-il] -2, 5-difeniltetrazólio, Sigma). Resumidamente, as células foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS) e, posteriormente, foram adicionados 100 μ L do reagente de MTT (0,5 mg/mL) em cada poço, e a placa foi incubada por 1h45m a 37 °C,

período em que a precipitação de cristal-residual (coloração roxa) foi claramente visível, indicativo da redução do MTT pelas células metabolicamente ativas. Então, 100 µL de DMSO foram adicionados em cada poço e a placa foi colocada em agitador de placas à temperatura ambiente, até a completa dissolução dos cristais. Finalmente, a absorbância foi lida em espectrofotômetro ($\lambda = 570$ nm, Hidex, procedência Estados Unidos) e os resultados foram expressos em porcentagem de células viáveis tratadas em relação ao grupo controle.

6.7.3. Expressão proteica

Para a análise de expressão proteica foi utilizado a técnica de *Western Blotting*, para isso, as células H9c2 foram cultivadas em placas de 6 poços. No modelo experimental I, na densidade inicial de $6,5 \times 10^3$ células/cm², e após 24h, as células foram expostas aos tratamentos, conforme descritos no item 6.2. Para a verificação da diferenciação das células do modelo experimental II, as células foram coletadas após diferenciadas conforme descrito no item 6.6 ou coletadas sem diferenciação após 48h do plaqueamento. No modelo experimental II, após a diferenciação descrita no item 6.6, foram expostas aos tratamentos conforme descritos no item 6.3.

Após os respectivos tratamentos, as células foram lavadas com PBS e lisadas com 1x Tampão RIPA (50 mM Tris, pH 8,0, 150 mM NaCl, 1,0% IGEPAL® CA-630, 0,5% desoxicolato de sódio, 0,1% SDS, 10 mM ortovanadato, 10 mM de fluoreto de sódio, protease coquetel inibidor Sigma Fast). A proteína total foi quantificada por Bradford (Bio-Rad) e 40-50 µg carregados em SDS-PAGE antes de transferir para uma membrana de nitrocelulose de 0,22 µm. As membranas foram bloqueadas com albumina de soro bovino a 5% em tampão de lavagem (TBS-0,1% Tween-20) e incubadas com os anticorpos primários corrigidos pela Vinculina (R&Dsystems, 1:1.000) como controle, e então foram incubadas com anticorpos secundário anti-mouse ou anti-rabbit (Cell Signaling, 1:10.000) conjugadas com HRP. Após reação de quimiluminescência utilizando o reagente (Bio-Rad), a análise densitométrica das bandas proteicas foi realizada utilizando o ImageJ®.

No modelo experimental I foram utilizadas os anticorpos primários utilizando os anticorpos primários anti Complexo OXPHOS (Abcam, 1:1.000), anti-Mitofusina-2 (Cell Signaling, 1:1.000), anti-LC3A/(Cell Signaling, 1:1.000), anti-UCP3 (Sigma, 1:1.000), anti-Citocoromo c (Santa Cruz, 1:1.000) e anti-Troponina I (Abcam, 1:1000).

Para a verificação da diferenciação celular utilizada no modelo experimental II foi utilizado o anticorpo primário anti-Troponina I (Abcam, 1:1000).

6.7.4. Expressão gênica

Além da análise da expressão proteica, através do *Western Blotting*, também foi realizada análise da expressão gênica da Troponina T para a verificação da diferenciação celular, o qual foi em colaboração com o grupo do Prof Dr Paolo Porporato, em Turin, Italia, durante a realização do Estágio de Pesquisa no Exterior (BEPE). Para isso, as células H9c2 foram cultivadas em placas de 24 poços e coletadas após diferenciadas conforme descrito no item 6.6 ou coletadas sem diferenciação após 48h do plaqueamento. Após o período, o RNA total foi extraído das células utilizando o reagente TRIzol (Invitrogen 15596026), seguindo as instruções do fabricante. Posteriormente, 1 µg de RNA total foi submetido a transcrição reversa utilizando o kit High Capacity cDNA Reverse Transcriptase (Applied Biosystems 4374966). O cDNA gerado foi então submetido à análise de PCR Quantitativo em Tempo Real, utilizando o sistema Real-Time PCR ABI PRISM 7900HT FAST (Applied Biosystems) e o SYBR Green master mix (Applied Biosystems A25741). Os níveis relativos de mRNA, para os primers descritos na Tabela 2, foram determinados utilizando o método $2^{-\Delta\Delta CT}$ e normalizados para o GAPDH.

Tabela 2. Dados dos genes utilizados para expressão proteica da Troponina T e housekeeping GAPDH

Gene	Forward sequence (5'-3')	Reverse sequence (5'-3')
TNNT2 - XM_039090363.2 <i>Rattus norvegicus</i> troponin T2, cardiac type (Tnnt2), transcript variant X1, mRNA	TTCGACCTGCAGGAAAAGTT	GTGCCTGGCAAGACCTAGAG
GAPDH - XM_063267938.1 <i>Rattus norvegicus</i> glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-like (LOC134480428), mRNA	GGCACAGTCAAGGCTGAGAATG	ATGGTGGTGAAGACGCCAGTA

6.7.5. Respiração Celular

As células H9c2 foram cultivadas em frascos de 75 cm² ou em placas de cultura de 24 poços Seahorse XFe24 à densidade inicial de 6,5 x 10³ células/cm² e após 24h foram expostos aos tratamentos, conforme descritos no item 6.2 – modelo experimental I. No modelo experimental II, as células foram plaqueadas em placas de cultura de 24 poços Seahorse XFe24, diferenciadas conforme descrito no item 6.6 e tratadas conforme item 6.3.

Após o tratamento, a taxa de consumo de oxigênio (TCO) foi avaliada a partir da medida da respiração celular, utilizando-se duas metodologias e dois modelos de Respirômetro de Alta Resolução diferentes, uma análise foi realizada no equipamento com sistema 2k-oxigráfico da marca OROBOROS (Áustria), em parceria com o Professor Dr. Leonardo dos Reis Silveira e Dr André Gustavo de Oliveira, no Centro de Pesquisa em Obesidade e Comorbidades, UNICAMP e a outra análise foi feita utilizando-se o equipamento da marca Seahorse modelo

XFe24 (*XF Analysers, Aligent, Santa Clara, CA United States*) em parceria com o Professor Dr. Pedro Manoel Mendes de Moraes Vieira no Departamento de Genética, Evolução, Microbiologia e Imunologia, UNICAMP e colaboração com a Mestranda Ninon Melany Flores Barrios do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, UNICAMP. Resumidamente, na metodologia para a utilização do OROBOROS, somente no modelo experimental I, as células ($\sim 10^6$) foram suspensas em 2 mL de DMEM-sup a 37°C e colocadas no respirômetro equipado com o software DataLab 5.0 para monitoramento de consumo de oxigênio. Após a estabilização do consumo de oxigênio, foi adicionado oligomicina (2 $\mu\text{g/mL}$), para inibir a ATP sintase, seguido do carbonil cianeto m-clorofenil- hidrazona (CCCP) (2 μM), para induzir o desacoplamento mitocondrial (respiração máxima). Finalmente, foi adicionado antimicina A (1 μM) para inibir a respiração mitocondrial. O pacote de software DatLab (OROBOROS, Innsbruck, Áustria) foi usado para aquisição de dados (intervalos de 2 segundos) e análise. A TCO foi expressa como $\text{pmol O}_2 \times \text{s}^{-1} \times \text{célula}$ (normalização pelo número de células).

Na utilização do equipamento da marca Seahorse, modelos experimentais I e II, uma hora antes do ensaio, as células foram incubadas em tampão DMEM livre de fenol (pH 7,4) suplementado com 4 mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato de sódio e 25 mM de glicose a 37°C sem CO₂. Após o período de 1h, a taxa de consumo de oxigênio (TCO) basal foi medido e as seguintes drogas foram injetadas sequencialmente, diretamente pelo equipamento, após a medição da TCO basal: 1 μM de oligomicina, para inibir a ATP sintase, 2 μM do CCCP, para desacoplar o transporte mitocondrial de elétron da síntese de ATP, e 1 μM de antimicina A para bloquear a respiração mitocondrial. A TCO não mitocondrial foi subtraída de todos os valores absolutos. Após o ensaio, as células foram fixadas e coradas com cristal violeta para normalização e os dados foram analisados utilizando o software Seahorse XFe Analyzers Wave 2.6.3 (EUA).

6.7.6. Potencial de membrana mitocondrial

As células H9c2 foram cultivadas em placas de 96 poços em DMEM-sup, à densidade inicial de $6,5 \times 10^3$ células/cm², após 24h foram expostas aos tratamentos descritos no item 6.2 – modelo experimental I. Para o potencial de membrana mitocondrial, as células foram coradas com 50 nM de tetrametilrodamina, éster metílico (TMRM) por 30 min a 37 °C e a fluorescência medida a (540 nm/580 nm). A normalização da densidade celular foi realizada com o corante de núcleo Horsch. As imagens foram adquiridas com o leitor de placa Cytation 5 (*Imaging Multimode Readers, Aligent, Santa Clara, CA United States*), equipamento utilizado em

parceira com o Professor Dr. Marcelo Bispo de Jesus, no Departamento de Bioquímica e Biologia Tecidual, UNICAMP.

6.7.7. Imunofluorescência

As células foram semeadas em lamínulas ou diretamente na placa de 24 poços e diferenciadas conforme descrito no item 6.6 e tratadas conforme descrito no item 6.3 – modelo experimental II. Então, as células foram fixadas com paraformaldeído (4%, vol./vol.) e permeabilizadas com Triton X-100 (0,5%, vol./vol.). Para análise morfológica das células H9c2, foi utilizado o anticorpo primário Monoclonal Anti-Skeletal Myosin (FAST) – Sigma (M 4276), 1:400 em 2% de BSA em PBS, overnight a 4°C para a detecção da miosina, e para a detecção de F-actina, as células foram coradas com tetrametilrodamina (TRITC) - faloidina (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) por 30 minutos em temperatura ambiente. Para a detecção da imunofluorescência, foi utilizado o anticorpo secundário Goat Anti-Mouse IgG H&L (Alexa Fluor® 488) - Abcam (ab150113), 1:200 em 2% de BSA em PBS, incubado por 1 hora em temperatura ambiente. Posteriormente foram incubadas com DAPI, Sigma (D9542), 1µg/ml em PBS por 5 minutos, para a coloração dos núcleos. As imagens foram adquiridas com o equipamento leitor de placa Cytation 5 em parceria com o Professor Dr. Marcelo Bispo de Jesus, no Departamento de Bioquímica e Biologia Tecidual, UNICAMP.

6.7.8. Análise dos resultados

Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão. As comparações estatísticas foram realizadas com a utilização do teste *one-way* ANOVA seguido do teste de *Tukey* para comparação múltipla, ou pelo *test-t Student* quando a comparação foi realizada entre dois grupos (Graph Pad Prism software, v 9.00). A significância estatística foi considerada para $p < 0,05$. Para análise dos metabolitos do líquido ascítico foi utilizada a plataforma MetaboAnalyst, (<https://www.metaboanalyst.ca/MetaboAnalyst/ModuleView.xhtml>), a estatística foi realizada utilizando a “*Statistical Analysis [one factor]*” com a opção de *test-t*, as vias relacionadas aos compostos com valor de $p < 0,05$ foram analisados para determinação das vias impactadas, utilizando a opção “*Pathway Analysis*”.

7. Resultados

O presente trabalho apresenta resultados dos efeitos indiretos da evolução tumoral, na qual foram estabelecidos dois modelos de caquexia cardíaca em cultura de células H9c2 não

diferenciadas e expostas ao líquido ascítico e em cultura de células H9c2 diferenciadas, em cardiomiócitos, expostas ao soro de rato caquético e tratadas ou não com L-leucina.

7.1. Citocinas pró-inflamatórias

A análise do líquido ascítico e do soro de ratos caquéticos mostrou que foram detectadas a presença das interleucinas IL-1 β e IL-10 (Tabela 3). As citocinas IL-4, IL-6, INF- γ e TNF- α estavam abaixo do limite de detecção. Ambas as citocinas IL-1 β e IL-10 apresentaram concentrações maiores no líquido ascítico em relação ao inativado, e suas concentrações foram maiores no soro de ratos caquéticos em relação ao soro de animais saudáveis. Importante salientar que as amostras tratavam-se de pool de cada grupo, o mesmo aplicado nas células, as repetições e variações foram decorrentes às variações de manipulação e ao equipamento.

Tabela 3. Citocinas pró-inflamatória e anti-inflamatória detectadas no líquido ascítico, inativado ou não e no soro de animais caquéticos ou saudáveis

Interleucina/Amostras	Líquido Ascítico	Líquido Ascítico Inativado	p-valor	Soro de Ratos Saudáveis	Soro de Ratos Caquéticos	p-valor
IL-1 β (pg/mL)	51,67 $\pm$ 1,12	37,75 $\pm$ 1,69*	<0.05	1,59 $\pm$ 2,25	15,50 $\pm$ 5,05	0,07
IL-10 (pg/mL)	35,4 $\pm$ 0,01	13,15 $\pm$ 1,42*	<0.01	0,50 $\pm$ 0,71	23,77 $\pm$ 0,71**	< 0.001

Significância * para $p < 0.05$ e ** para $p < 0,01$, realizado através do *test-t Student*. (triplicata).

7.2. Perfil metabolômico do líquido ascítico e líquido ascítico inativado

Analizamos o líquido ascítico e líquido ascítico inativado quanto ao perfil metabolômico, já que foram encontradas alterações das respostas celulares em função das características de cada tratamento. Foram encontrados 58 metabólitos no líquido ascítico e no líquido ascítico inativados (Tabela no Anexo 1), dentre esse total de metabólitos, 5 apresentaram diferenças estatísticas significativas de concentração (Figura 6), sendo eles a dimetilamina (LA=0,0075mM; LI=0,00305mM), glicina (LA=21605mM; LI=0,2096mM), lactato (LA=2,7786mM; LI=2,64975mM), citrato (LA=0,00755mM; LI=0,0053mM) e piruvato (LA=0,03785mM; LI=0,04415mM). A dimetilamina e o piruvato apresentaram maior concentração no líquido inativado, em relação ao líquido ascítico, e os outros compostos, glicina, lactato e citrato, estavam em maior concentração no líquido ascítico em relação ao líquido inativado.

Assim, de acordo com o perfil metabolômico do líquido ascítico e líquido ascítico inativado, a partir dos metabólitos discrepantes em que as células H9c2 foram expostas,

obtivemos que o metabolismo de serina e glicina, metabolismo do ciclo do ácido tricarboxílico e metabolismo do piruvato foram as principais vias metabólicas impactadas (Figura 7). Esses dados sugerem que as células tratadas com líquido ascítico inativado expostas à maior concentração de piruvato possivelmente foram favorecidas ao metabolismo oxidativo, ao contrário das células expostas ao líquido ascítico, contendo todos os fatores produzidos pelas células tumorais e respostas dos animais portadores de tumor, que possivelmente favoreceu o metabolismo glicolítico. Como as amostras corresponderam ao pool de cada grupo, o mesmo aplicado nas células, as repetições e variações devem-se à possíveis variações do equipamento, além de procedimentos.

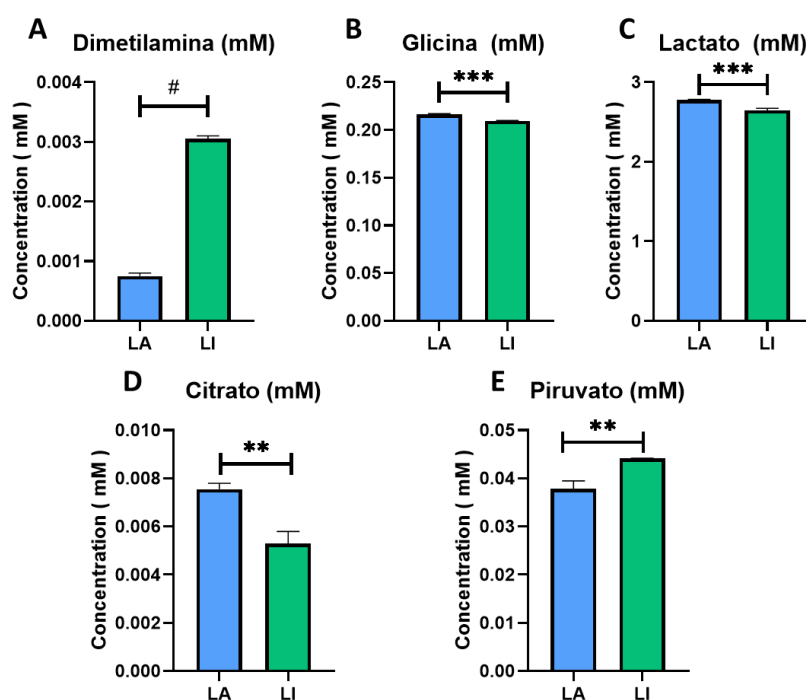


Figura 6. Concentração de metabólitos presente no líquido ascítico e líquido ascítico inativado. Concentração em milimolar (mM) dos metabólitos dimetilamina, glicina, lactato, citrato e piruvato em com diferença significativa encontrados no líquido ascítico (LA) e no líquido ascítico inativado (LI) (triplicata). Os demais metabólitos estão descritos na Tabela Anexo I. Valores expressados como média $\pm$ desvio padrão. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, # $p < 0.0001$.

7.1. Modelo Experimental I

7.1.1. Viabilidade, respiração celular e potencial de membrana mitocondrial das células H9c2 expostas ao líquido ascítico

As células H9c2 expostas ao líquido ascítico - grupo A - apresentaram alteração nas características celulares (Figura 8A) assim como diminuição na viabilidade celular (Figura 8B) de 41,0% em relação às células controle - grupo C, e de 38,5% em relação às células expostas

com líquido ascítico inativado – grupo I. Já a comparação entre o grupo I em relação ao C, mostrou que ambas as células apresentaram padrão semelhante.

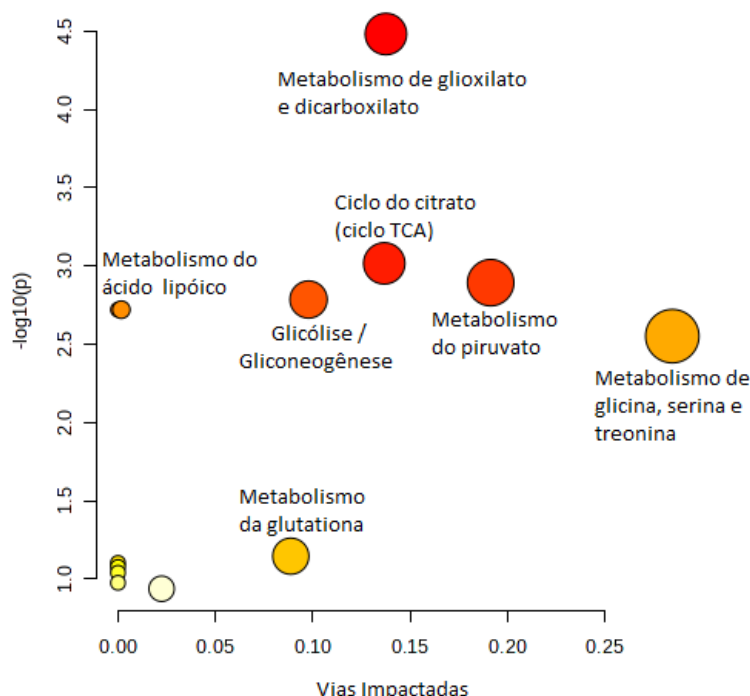


Figura 7. Vias impactadas em função do perfil metabolômico do líquido ascítico e líquido ascítico inativado, aos quais as células H9c2 foram expostas. Valores de p obtidos pela plataforma MetaboAnalyst (<https://www.metaboanalyst.ca/MetaboAnalyst/upload/PathUploadView.xhtml>).

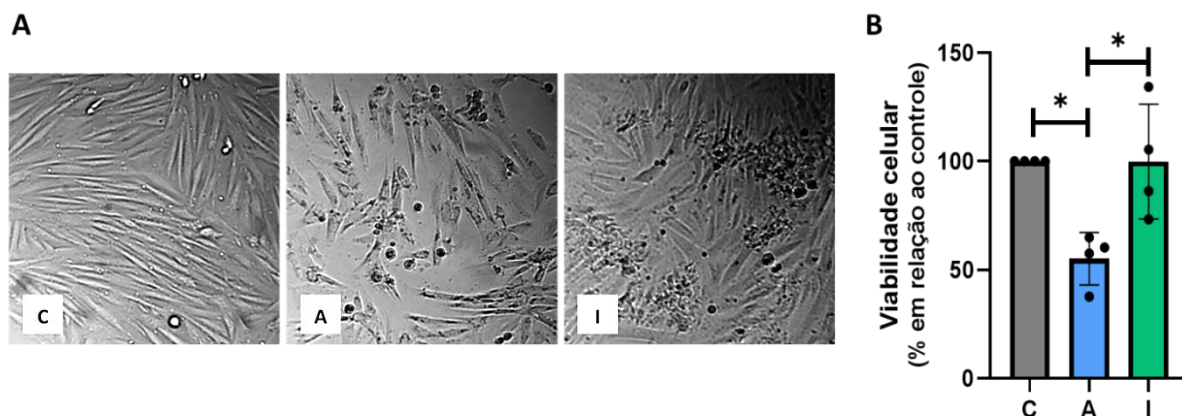


Figura 8. Viabilidade celular de cardiomioblastos H9c2 controle e expostos à 5% de líquido ascítico e de líquido ascítico inativado por 48h. **A:** Imagens representativas da cultura de células H9c2, fotografadas em microscópio de contraste de fase para análise morfológica qualitativa das células H9c2 expostas ao líquido ascítico, ou ao líquido ascítico inativado, comparadas com grupo controle. Nas imagens pode-se verificar que, as células expostas ao líquido ascítico apresentaram menor densidade celular com perda de contato entre células e de aderência celular, além de células com características de inviabilidade (alteração de formato e detritos celulares); quando as células foram expostas ao líquido ascítico inativado, pode-se notar que foi mantida a densidade celular, além do contato e aderência celular, porém também com aumento de células inviáveis ou restos celulares (aumento de 20x). **B:** Viabilidade celular, avaliada pelo teste MTT, representada em % em relação ao controle (N=4). Maiores detalhes descritos em Materiais e Métodos (item 6.7.2) Legenda: C=grupo controle; A=células expostas ao líquido ascítico; I=células expostas ao líquido ascítico inativado. Valores expressados como média $\pm$ desvio padrão. *p < 0.05.

Considerando que a viabilidade das células tratadas com líquido ascítico diminuíram, indicando possível comprometimento na atividade mitocondrial, foi avaliado a taxa de consumo

de oxigênio a fim de analisar se havia relação com possíveis prejuízos na captação mitocondrial de oxigênio e como consequência diminuição na produção de ATP. Primeiramente a análise foi feita utilizando o equipamento OROBOROS, visto que a colaboração do nosso grupo de pesquisa permitia a utilização dessa metodologia. Entretanto, com a possibilidade de utilização de equipamentos multiusuários no Instituto de Biologia, que poderiam proporcionar avanço quanto à metodologia e também corroborar os resultados prévios, foi utilizado o equipamento Seahorse. Os resultados das duas metodologias foram similares em ambos os equipamentos.

Assim na Figura 9A é possível observar a variação da curva do consumo de oxigênio das células H9c2 expostas ao líquido ascítico, em comparação ao líquido ascítico inativado e ao controle, pelo perfil gerado pelo equipamento Seahorse. A Figura 9B expressa a quantificação da TCO obtida pelo equipamento OROBOROS, após a normalização pelo número de células, o consumo basal de oxigênio (Respiração basal) do grupo A foi 15,1% menor que C e 32,4% menor que I, sendo que o grupo I foi 20,4% maior que C. O consumo de oxigênio ligado à ATP sintase (Produção de ATP) do grupo A foi 15,4% menor que C e 39,4% menor que I, sendo que o grupo I foi 28,4% maior que C. Em relação ao vazamento de prótons, o grupo A foi similar ao C, porém 13,5% menor que I, sendo que esse grupo I apresentou 10,0% maior que C. A taxa máxima de consumo de oxigênio (Respiração máxima) do grupo A foi discretamente menor que C, porém 22,0% menor que I, sendo que o grupo I foi 16,4% maior que C. Por fim, a capacidade de reserva de oxigênio (Reserva) do grupo A foi 9,4% menor que C e 16,2% menor que I, sendo que o grupo I foi 7,5% maior que C.

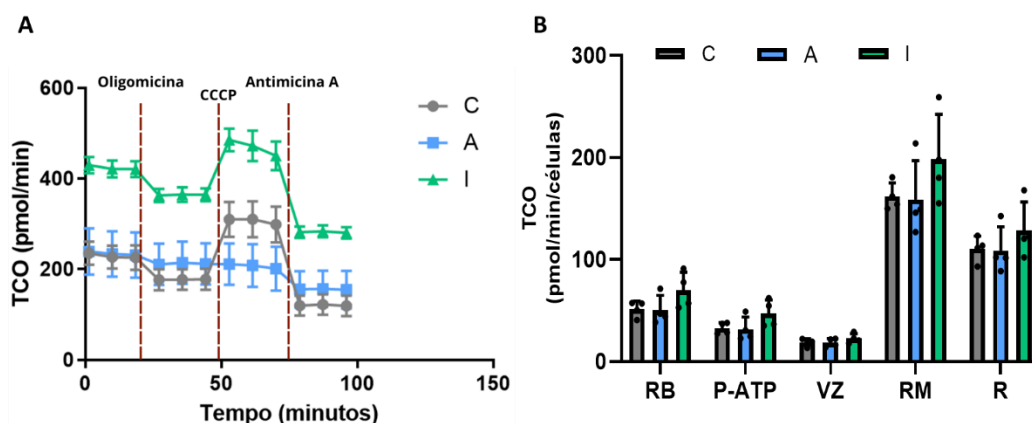


Figura 9. Taxa de consumo de oxigênio (TCO) de cardiomioblastos H9c2 controle e expostos à 5% de líquido ascítico e de líquido ascítico inativado por 48h. **A:** Perfil do consumo de oxigênio utilizando Seahorse, dados brutos sem a normalização pelo teor de proteína, as células foram tratadas sequencialmente com Oligomicina (1 μ M), FCCP (2 μ M) e Antimicina A (1 μ M). Mais detalhes estão descritos na seção Materiais e Métodos (item 6.7.5). **B:** Quantificação da taxa de consumo de oxigênio utilizando o equipamento OROBOROS, normalizado pelo número de células, as células foram tratadas sequencialmente com Oligomicina (2 μ M), FCCP (2 μ M) e Antimicina A (1 μ M), RB (Respiração basal), P-ATP (consumo de oxigênio relacionado à produção de ATP), VZ (Vazamento de prótons), RM (Respiração máximas), R (Capacidade de reserva de oxigênio). 4 experimentos (N=4). Legenda: C=grupo controle; A=células expostas ao líquido ascítico; I= células expostas ao líquido ascítico inativado. Valores expressados como média $\pm$ desvio padrão.

Ao observarmos alterações quanto a respiração celular, propusemos avaliar o potencial de membrana mitocondrial em função dos efeitos deletérios produzidos pelo tumor, agora avaliado pela exposição ao líquido ascítico. Assim, na análise do potencial da membrana mitocondrial de maneira qualitativa (Figura 10), pudemos observar que a marcação (em vermelho, que representa o acúmulo do reagente TMRM no interior das mitocôndrias, altamente carregadas negativamente) foi mais acentuada nos grupos C e I em relação ao grupo A, sugerindo que possivelmente a diferença do potencial de membrana mitocondrial foi alterado no grupo exposto ao líquido ascítico, como resultado do escape do TMRM das mitocôndrias, resultando em perda da intensidade fluorescente, e preservado quando houve inativação do líquido ascítico, comparado ao grupo controle.

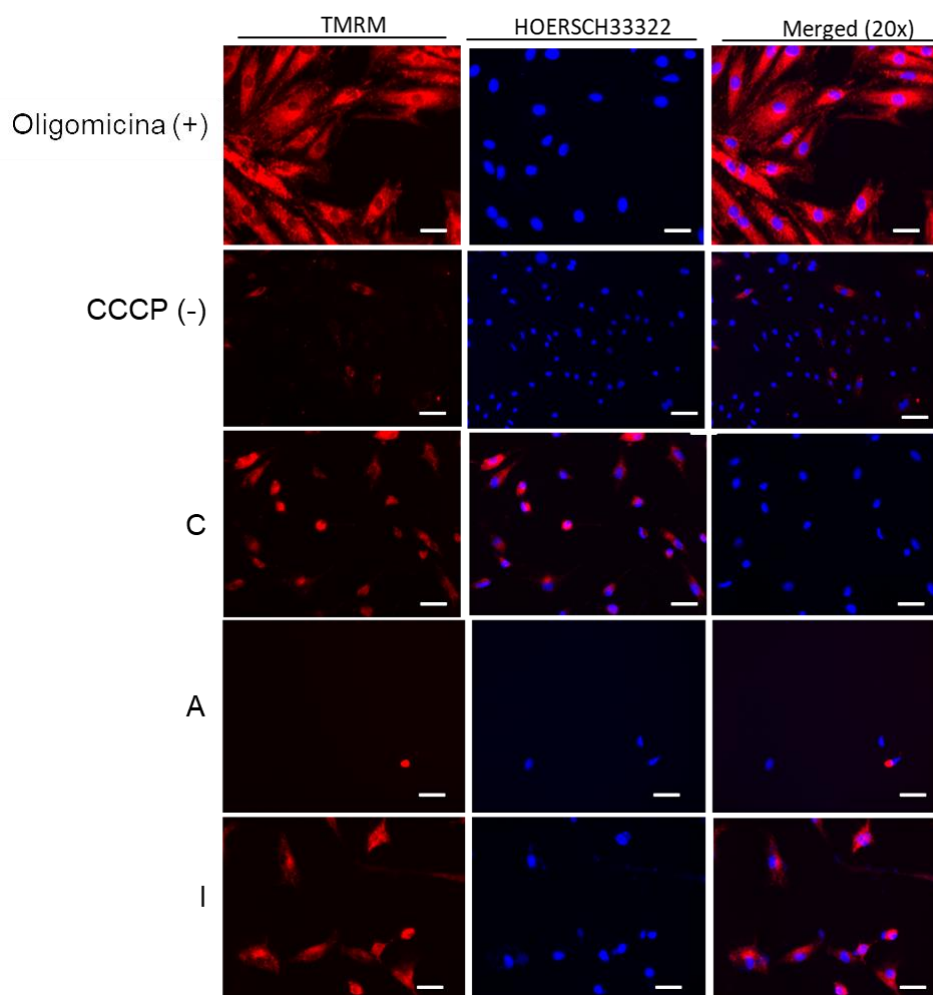


Figura 10. Potencial de membrana mitocondrial de cardiomioblastos H9c2 controle e expostos à 5% de líquido ascítico e de líquido ascítico inativado por 48h. Potencial de membrana mitocondrial utilizando o reagente TMRM (coloração vermelha), e HOERSCH para núcleo (coloração azul), oligomicina como controle positivo e cccp como controle negativo. Legenda: C=grupo controle; A=células expostas ao líquido ascítico; I= células expostas ao líquido ascítico inativado.

7.1.2. Expressão de proteínas relacionada às vias mitocondriais, autofagia e marcador de dano cardíaco das células H9c2 expostas ao líquido ascítico

Verificamos que a expressão proteica das proteínas que compõem o complexo da cadeia respiratória de elétrons OXPHOS (Figura 11), apresentaram diferença estatisticamente significativa na expressão de proteínas do Complexo II (succinato desidrogenase – SDH) entre os grupos A e I, sendo que o grupo A apresentou expressão 25,0% menor que no grupo I e 24,0% menor que no grupo C; em contrapartida não houve diferença entre o grupo I em relação ao C. Nos outros complexos também houve tendência à redução no grupo A em relação aos outros grupos. O Complexo I (NADH desidrogenase) do grupo A foi 24,0% menor que no grupo C e cerca de 6,2 % menor que I, e I foi 19% menor que C. O Complexo III (citocromo bc1) do grupo A foi 15,0% menor que C e 25,5% menor que I, e I 14,0% menor que C. Já o Complexo V (ATP sintase 5A) no grupo A foi 9,0% menor que C e 11,6% menor que I. Embora haja diferença reduzida, foi clara a tendência de redução das proteínas do complexo OXPHOS no grupo exposto ao líquido ascítico em relação ao grupo controle e em contraprova com o líquido ascítico inativado.

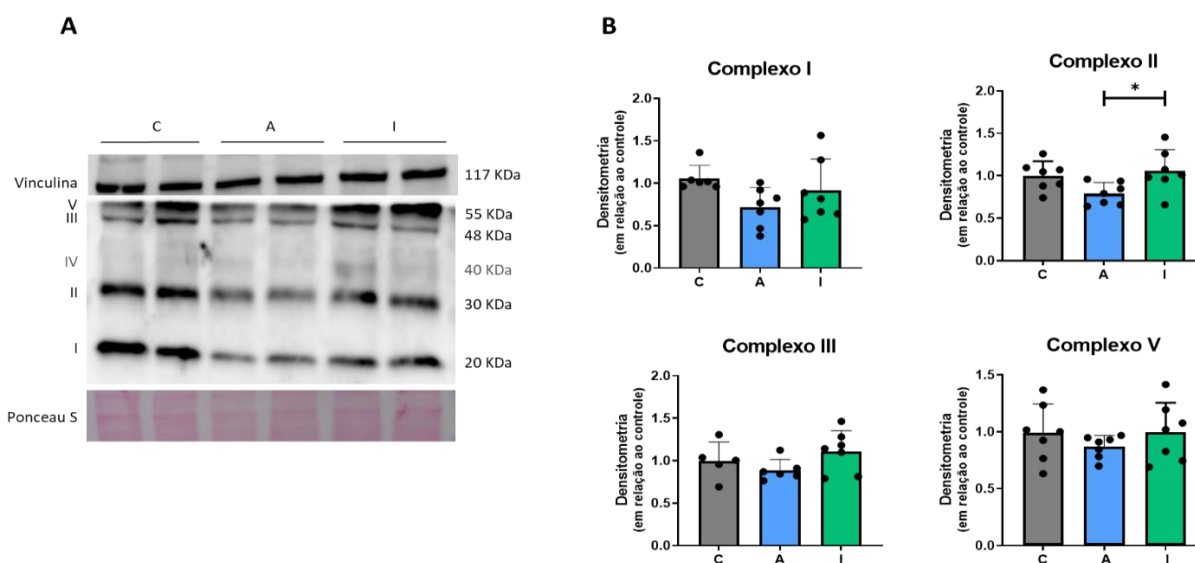
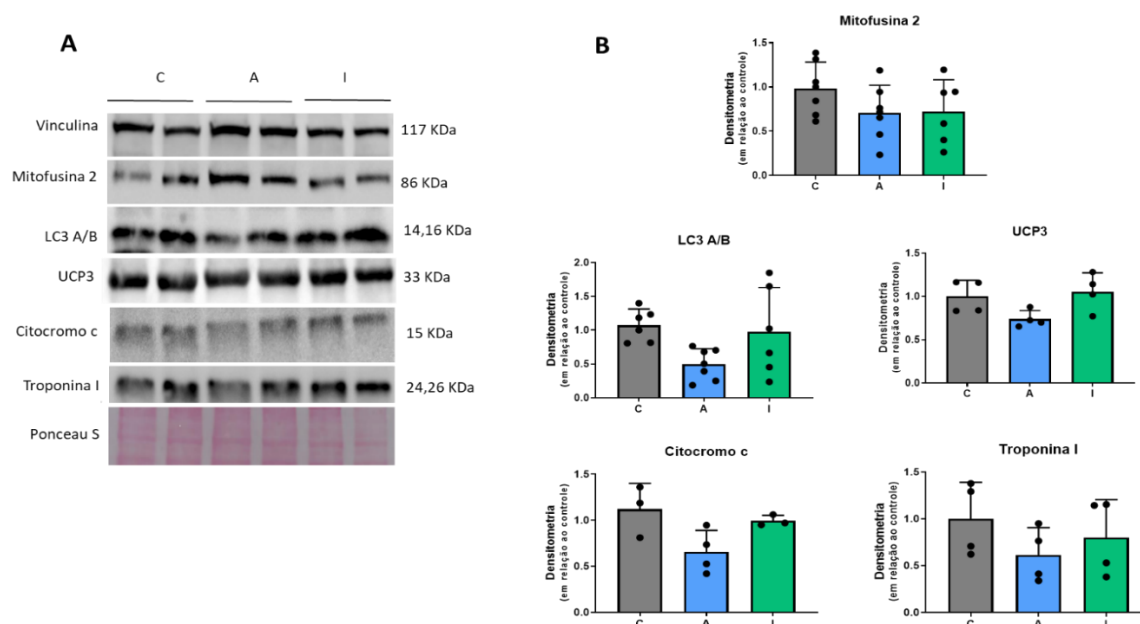


Figura 11. Expressão das proteínas OXPHOS em cardiomioblastos H9c2 controle, expostos à 5% de líquido ascítico e de líquido ascítico inativado por 48h. A: Imagens representativas das membranas utilizadas (total de 3 membranas, para 7 amostras por grupo, realizados em 3 experimentos independentes) nas análises por *Western Blotting* das proteínas OXPHOS; B: Plotagem da expressão da quantificação por *immunoblotting* das proteínas OXPHOS (complexos I, II, III e V), normalizadas com *housekeeping* Vinculina, valores em relação ao controle. Análises de densitometria normalizado pelo *fold change* (N=3). Legenda: C=grupo controle; A=células expostas ao líquido ascítico; I= células expostas ao líquido ascítico inativado. Valores expressados como média $\pm$ desvio padrão. *p < 0.05.

Foi feito também *screening* da expressão de outras proteínas envolvidas na atividade celular (Figura 12) para melhor compreensão dos efeitos do líquido ascítico sobre as células cardíacas. A mitofusina 2, que também está relacionada com a função mitocondrial, foi 28,0%

menos expressa no grupo A em relação ao C e 5,2% menor em relação ao grupo I; já o grupo I foi 24,0% menor em relação ao C. Avaliou-se a autofagia, onde a expressão da proteína LC3A/B foi 54,0% menor no grupo A em relação ao C e 40,2% menor em relação ao I, e o grupo I foi 23,0% menor que C. A expressão do Citocromo c foi 47,0% menor no grupo A em relação ao C e 35,4% menor em relação ao I; já o grupo I foi 18,0% menor em relação ao C. Foi avaliada a expressão da proteína UCP3, desacoplador mitocondrial, sendo sua expressão 29,0% menor no grupo A em relação ao C e 34,3% menor em relação ao I, e o grupo I foi 8,0% menor que C. Também foi utilizada a Troponina I como marcador de dano cardíaco para analisar outros possíveis efeitos do líquido ascítico, sendo 41,0% menos expressa no grupo A em relação ao C e 30,0% menos em relação ao grupo I.



7.2. Modelo Experimental II

7.2.1. Verificação do protocolo de diferenciação celular

Para aproximar os ensaios *in vitro* às condições do animal com tumor, juntamente com seu respectivo controle (também simulando condições de ratos saudáveis), foram realizados ensaios com células H9c2 diferenciadas expostas ao soro de rato caquético portador de tumor

de Walker-256, tendo como controle as células diferenciadas expostas ao soro de ratos saudáveis.

Para identificar o padrão morfológico de diferenciação e melhor análise, as células foram coradas com cristal violeta e fotografadas antes e após o processo de diferenciação, e a partir de análise qualitativa, de vários ensaios experimentais (mínimo de 3 experimentos independentes, em triplicata, com registro de mínimo de 6 poços por placa), foram avaliadas quanto à caracterização de diferenciação. A Figura 13 representa as células H9c2 não diferenciadas (ND) e as células diferenciadas (D) conforme descrito no item 6.6, no aumento de 40x. É possível observar que após a diferenciação as células ficaram mais alongadas em relação aos cardiomioblastos não diferenciados (ND), além de algumas células apresentarem-se multinucleadas.

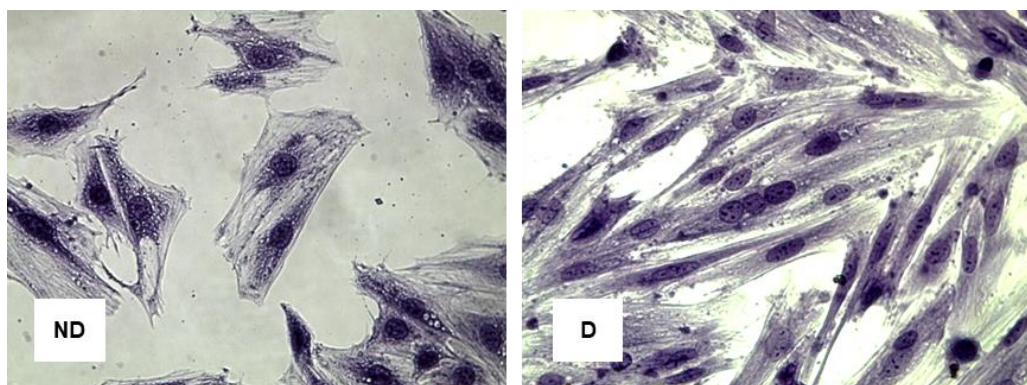


Figura 13. Células H9c2 não diferenciadas em comparação às células diferenciadas. Células coradas com cristal violeta e fotografadas em microscópio de contraste de fase para análise morfológica qualitativa das células não diferenciadas (ND) e das células (D). Cardiomiócitos com características alongadas unindo-se nas extremidades com formato de rede interconectada, possuindo um ou mais núcleos localizados centralmente; é possível ainda observar estriações alongadas ao longo das células diferenciadas (aumento de 40x).

As Figuras 14A e 14B mostram o aumento da expressão proteica da troponina I, marcador cardíaco de diferenciação celular, sendo 72,1% mais expressa nas células diferenciadas. Para confirmação ainda mais precisa, durante estágio realizado na Universidade de Turin, Itália, - foi utilizado o mesmo protocolo aqui estabelecido e descrito, para análise da expressão gênica da troponina T (Figura 14C), onde foi observado aumento de 78,1% nas células diferenciadas.

Para observar se após o tratamento com soro de ratos, a morfologia das células diferenciadas foi preservada, as células do grupo controle, expostas ao soro de ratos saudáveis (C), e as células expostas ao soro de ratos caquéticos (W) foram fotografadas após a diferenciação e os respectivos tratamentos (Figura 15), mostrando que a morfologia das células foi preservada, através de análise qualitativa, de vários ensaios experimentais (mínimo de 3 experimentos independentes, em triplicata, com registro de mínimo de 6 poços por placa) .

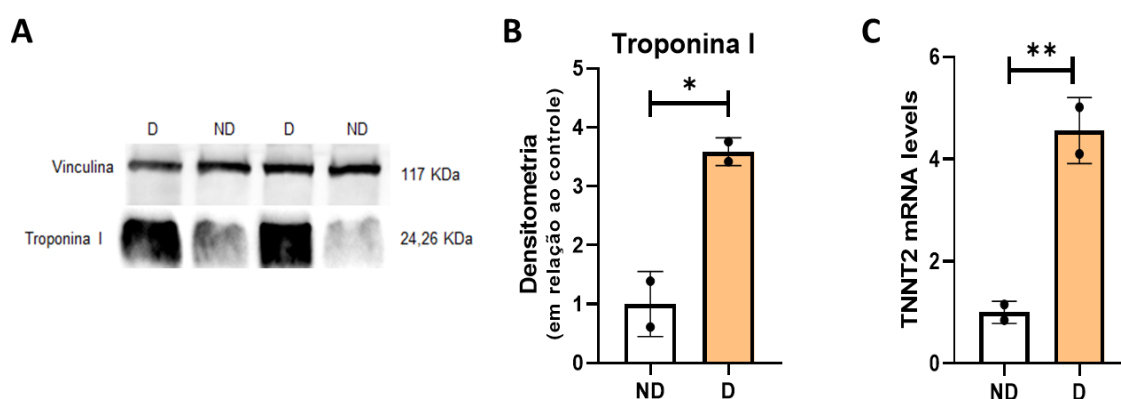


Figura 14. Expressão proteica e expressão gênica de marcadores de diferenciação das células H9c2. A: Imagem representativa da membrana utilizada nas análises por *Western Blotting* da proteína Troponina I, B: Plotagem da expressão da quantificação por *immunoblotting* da proteína Troponina I em células H9c2 não diferenciadas (ND) em comparação às células diferenciadas (D), normalizadas com o *housekeeping* Vinculina, valores em relação em relação ao grupo ND. Análises de densitometria normalizado pelo *fold change* (N=2). C: Expressão do gene TNNT2 (troponina T) em células diferenciadas (D) comparadas às células não diferenciadas (ND) (N=2). Valores expressados como média $\pm$ desvio padrão. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

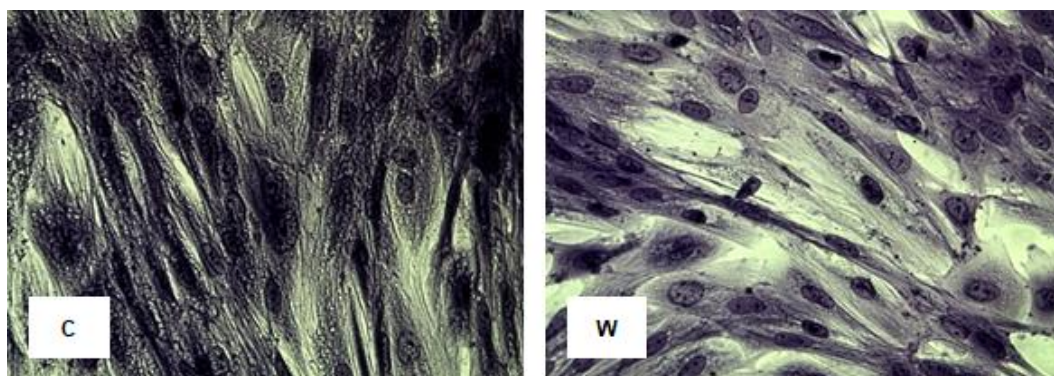


Figura 15. Células H9c2 diferenciadas tratadas com 5% de soro de ratos saudáveis em comparação às células H9c2 diferenciadas tratadas com 5% de soro de ratos caquéticos portadores de tumor de Walker-256. Células coradas com cristal violeta e fotografadas em microscópio de contraste de fase para análise morfológica qualitativa das células expostas a 5% de soro de rato saudáveis (C) a ser usada como grupo controle e das células expostas a 5% de soro de ratos caquéticos portadores de tumor de Walker-256 (W) mimetizando a caquexia (aumento 40x).

7.2.2. Curva dose-resposta à Leucina e tratamento com Leucina em células H9c2 diferenciadas expostas ao soro de ratos

As células H9c2 diferenciadas e expostas ao soro dos animais, tanto saudáveis quanto caquéticos, foram tratadas com leucina nas concentrações de 100 a 500 μ M (Figura 16A e 16B). Observamos que houve aumento da viabilidade celular nas concentrações de 200 μ M (9%), 250 μ M (10%) e 500 μ M (12%), em relação às células controle (C) no grupo expostos ao soro de ratos saudáveis (Figura 16A). Porém, não houve variação significativa na viabilidade nas células expostas ao soro de ratos caquéticos portadores de tumor (Figura 16B). A respostas dos cardiomiócitos à concentração de 250 μ M de leucina mostrou que houve manutenção da viabilidade das células W em relação ao grupo C, como observamos na Figura 16C, em que a diminuição da viabilidade nas células W foi de apenas 3,4% em relação à C. Porém, baseado

nas respostas da curva do grupo exposto ao soro de animais saudáveis e aos resultados prévios, a concentração de 250 μM foi mantida. A porcentagem de diferença entre o grupo W e WL mostrou manutenção da viabilidade celular nos dois grupos.

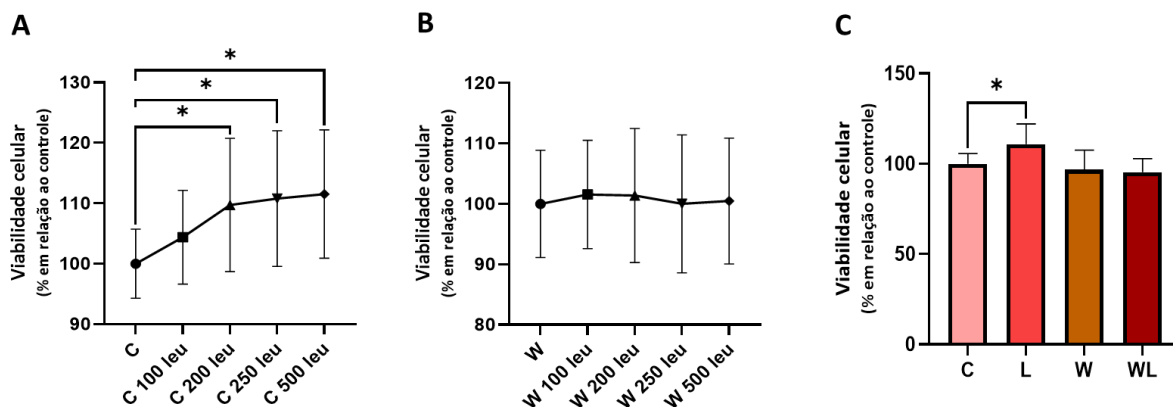


Figura 16. Viabilidade celular de cardiomiócitos H9c2 expostos à 5% de soro de ratos saudáveis e a 5% de soro de ratos caquéticos portadores de tumor de Walker-256 tratados com leucina por 48h. A: Células expostas ao soro de ratos saudáveis (C) e à diferentes concentrações de leucina (100 μM - 500 μM); porcentagem de aumento (%) em relação às células C. **B:** Células expostas ao soro de ratos caquéticos portadores de Tumor de Walker-256 (W) e às diferentes concentrações de leucina (100 μM - 500 μM); porcentagem de aumento (%) em relação às células W. **C:** Células expostas aos soros dos ratos saudáveis e caquéticos (C e W) e tratadas com 250 μM de leucina (L e WL); porcentagem de aumento (%) em relação ao grupo C (N=6-7). Valores expressados como média $\pm$ desvio padrão. * $p < 0.05$.

7.2.3. Respiração celular das células H9c2 diferenciadas expostas aos tratamentos com soro de rato saudável e de soro de rato caquético

A respiração celular dos cardiomiócitos expostos ao soro de ratos e tratados com leucina não apresentaram diferença significativa entre os grupos (Figura 17), mas o grupo W apresentou tendência à diminuição em todos os parâmetros em relação ao C. A leucina tendeu a melhorar as respostas celular no grupo C, apresentando tendência à diferentes respostas em relação ao grupo W. Assim, como apresentado no perfil da taxa de consumo de oxigênio, verificamos que as células expostas ao soro caquético e tratadas com leucina (WL) apresentaram maior respiração máxima, em relação às células H9c2 expostas ao soro de animal caquético (W) (Figura 17A).

Quanto a quantificação dos dados da taxa de consumo de oxigênio, na avaliação apenas do grupo W em relação ao grupo C, verificamos que na respiração basal, houve diminuição de 9,6 % no grupo W; consumo de oxigênio relacionado à produção de ATP foi 16,9% menor no grupo W; o vazamento de prótons no grupo W foi 6,7% menor; a respiração máxima foi 17,8% menor no grupo W; a capacidade de reserva de oxigênio foi 62,5% menor em W, além da respiração não mitocondrial que apresentou diminuição de 19,0% nesse grupo W em relação ao grupo controle. Assim, verificou-se que a exposição das células H9c2 ao soro de rato caquético alterou a taxa de consumo de oxigênio nesse modelo, mimetizando a caquexia.

Com relação ao tratamento com leucina, nas células H9c2 comparadas com o grupo controle, observou-se que a respiração basal aumentou em 4,7% no grupo L; o consumo de oxigênio relacionado à produção de ATP foi ligeiramente aumentado, com o vazamento de prótons 12,4% maior; a respiração máxima foi semelhante e a capacidade de reserva de oxigênio foi 5,4% maior em L, assim como a respiração não mitocondrial foi aumentada em 9,6% no grupo L. Desse modo o tratamento com leucina não afetou o processo de atividade mitocondrial das células H9c2, nas condições estudadas nesse trabalho.

Por outro lado, a respiração basal no grupo WL apresentou diminuição de 7,4% em relação ao W. O consumo de oxigênio relacionado à produção de ATP no grupo WL apresentou diminuição de 10,3% em relação ao W. O vazamento de prótons no grupo WL apresentou aumento de 15,2% em relação ao W. A respiração máxima no grupo WL foi ligeiramente aumentada (2,6%) em relação ao W. A capacidade de reserva de oxigênio no grupo WL apresentou diminuição de 11,3% em relação ao W. A respiração não mitocondrial apresentou diferença de cerca de 14% maior no grupo WL em relação ao W.

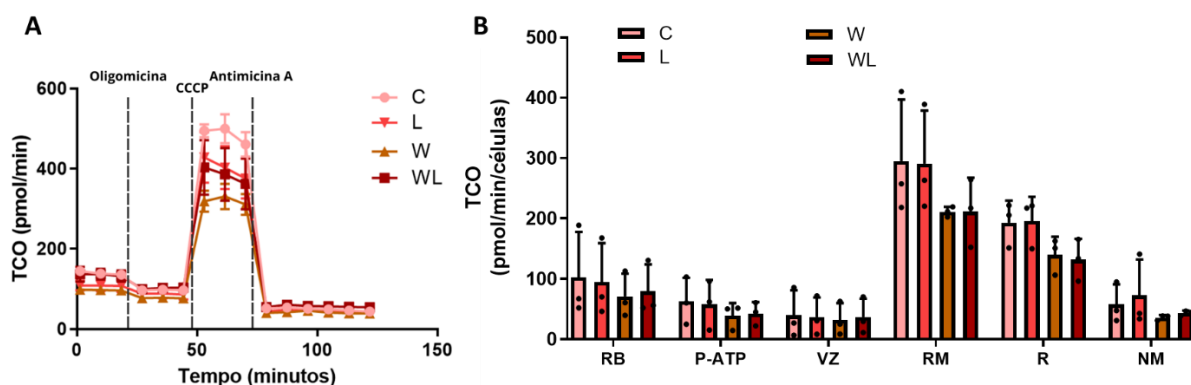


Figura 17. Taxa de consumo de oxigênio (TCO) de cardiomiócitos H9c2 expostos à 5% de soro de ratos saudáveis e a 5% de soro de ratos caquéticos portadores de tumor de Walker-256 e ao tratamento com leucina 250 μ M por 48h. **A:** Perfil do consumo de oxigênio utilizando Seahorse, dados brutos sem normalização por teor de proteína, as células foram tratadas sequencialmente com Oligomicina (1 μ M), FCCP (2 μ M) e Antimicina A (1 μ M). Maiores detalhes estão descritos na seção Materiais e Métodos. **B:** Taxa de consumo de oxigênio, normalizados por teor proteico, RB (Respiração basal), P-ATP (consumo de oxigênio relacionado à produção de ATP), VZ (Vazamento de prótons), RM (Respiração máximas), R (Capacidade de reserva de oxigênio), NM (respiração não mitocondrial), utilizando o equipamento Seahorse, expressos em pmol/s. (N=3). Legenda: C=grupo controle (células expostas ao soro de ratos saudáveis), L= grupo C + tratamento com leucina, W= células expostas ao soro de ratos caquéticos, WL= grupo W + tratamento com leucina. Valores expressados como média $\pm$ desvio padrão.

7.2.4. Imunofluorescência das células H9c2 diferenciadas expostas aos tratamentos com soro de rato

A análise imunocitoquímica das células H9c2 diferenciadas, quanto à expressão de actina e miosina, mostrou que a avaliação qualitativa da fluorescência nas células do grupo W, em relação ao grupo C, a fim de detectar alteração na morfologia e estrutura, não houve alterações significativa em relação à actina, porém a miosina apresentou pequena diminuição de intensidade no grupo W (Figura 18A). A análise foi repetida com o tratamento com leucina (Figura 18B), porém o anticorpo para a detecção de miosina e a técnica foram alterados. Assim,

em relação à actina, nestes dados também foi possível observar discreta diferença, com ligeira redução da expressão de actina nas células W em relação as células WL, utilizando-se apenas a avaliação qualitativa. Esses dados necessitam de análise quantitativa para complementar esses achados, porém foi possível verificar que nesse modelo *in vitro*, mimetizando a caquexia, que houve redução da principal proteína contrátil nos cardiomiócitos (Figura 18B).

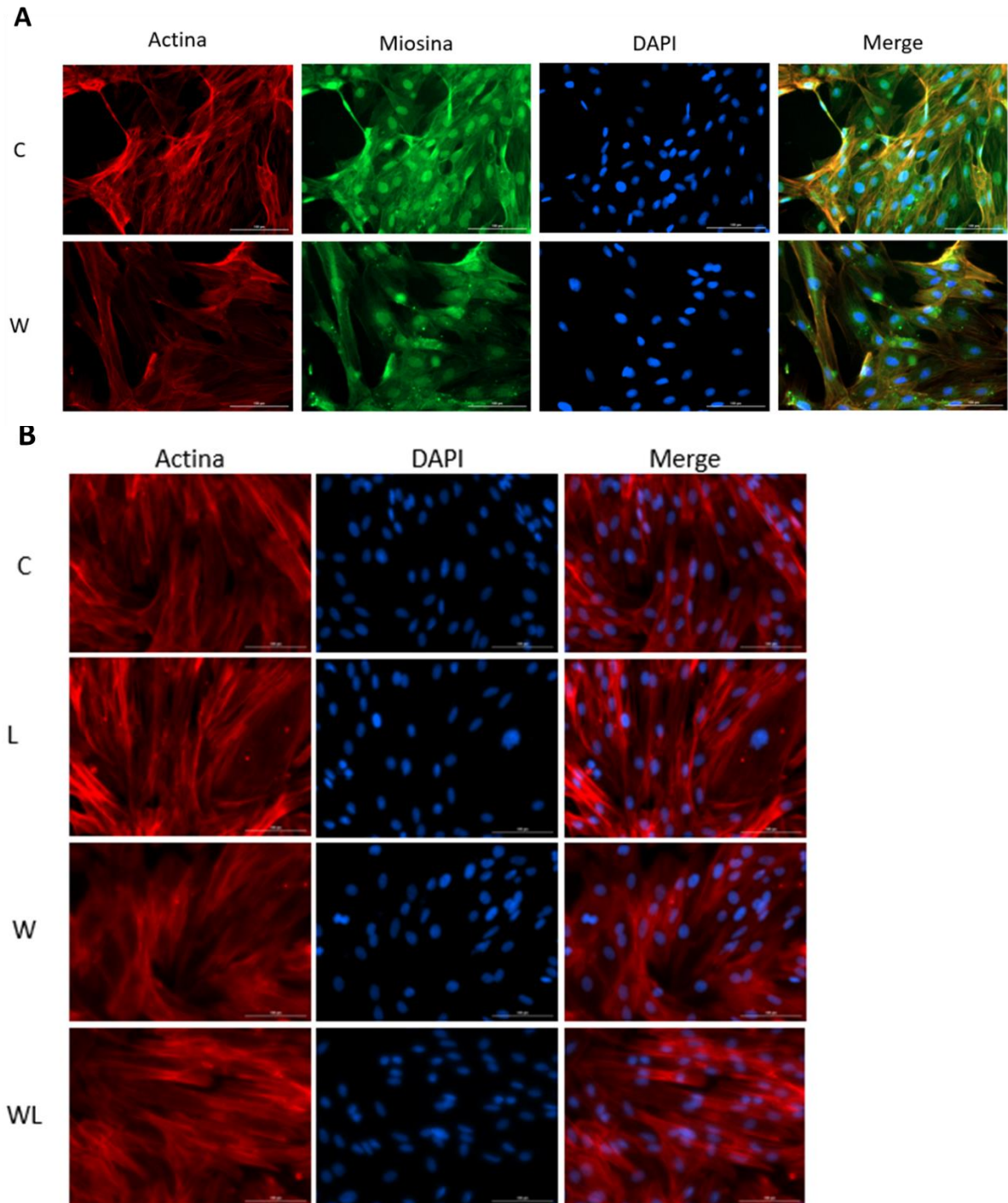


Figura 18. Imunofluorescência de miosina e actina de cardiomiócitos H9c2 expostos à 5% de soro de ratos saudáveis e a 5% de soro de ratos caquéticos portadores de tumor de Walker-256, e tratados ou não com leucina 250 μ M por 48h. A: Imagens capturadas sob microscopia no equipamento *Cytation* no aumento de 20x em ensaio de imunofluorescência para avaliar actina dos cardiomiócitos H9c2 expostos por 48h à 5% de soro de ratos saudáveis (C) e 5% de soro de ratos caquéticos portadores de tumor de Walker-256 (W) e tratados com 250 μ M de leucina (L e WL). B: Imagens capturadas sob microscopia no equipamento *Cytation* no aumento de 20x em ensaio de imunofluorescência para avaliar a expressão de miosina e actina dos cardiomiócitos H9c2 expostos por 48h à 5% de soro de ratos saudáveis (C) e 5% de soro de ratos caquéticos portadores de tumor de Walker-256 (W). Escala da barra: 100 μ m.

8. Discussão

Nos pacientes com câncer, o estabelecimento da caquexia corresponde a uma das principais causas de morte, sendo geralmente relacionada ao prognóstico ruim com reduzida sobrevida, pois é responsável por cerca de 20% das mortes relacionadas ao câncer (Tisdale, 2002, 2010). Considerando que aproximadamente 9,8 milhões de pessoas com câncer morrem a cada ano (IARC, 2018; IARC, 2020; WHO, 2020), essa patologia corresponde a um grave problema de saúde pública. No Brasil, são esperados 704 mil novos casos de câncer para cada ano, entre 2023 e 2025 (INCA, 2022). Logo, com a evolução do câncer culminando no desenvolvimento da caquexia, esse paciente além de apresentar diversas alterações metabólicas e hormonais, também há o desenvolvimento de disfunções cardiovasculares, denominado caquexia cardíaca (Murphy, 2016).

O carcinossarcoma de Walker-256 é um tumor que se assemelha aos efeitos produzidos por vários tipos de cânceres (como gastrointestinal, pulmonar, pancreático), estabelecendo o estado caquético em roedores. Diante disso, vem sendo extensivamente usado como modelo pré-clínico de indução de caquexia, em ratos (Emery, 1999; Penna *et al.*, 2016). Vários trabalhos utilizam o tumor de Walker-256 com o intuito de avaliar as alterações bioquímicas e metabólicas do hospedeiro caquético (Cruz; Gomes-Marcondes, 2014; Deminice *et al.*, 2016; Freitas *et al.*, 2001; Padilha *et al.*, 2017) e assim estudar a possível translação à clínica. Considerando que no estado de caquexia do câncer, e também em particular na caquexia cardíaca, há dificuldades em se obter resultados das avaliações clínicas, para este estudo, propusemos o desenvolvimento de modelo experimental mimetizando a situação de caquexia em cultura de células cardíacas. Desse modo, para desenvolver o modelo *in vitro* para a avaliação dos efeitos da caquexia, utilizamos o líquido ascítico além do soro dos animais caquéticos portadores do tumor de Walker para avaliarmos os efeitos deletérios sobre cardiomiócitos.

Inicialmente, estudos clínicos mostram que uma das principais alterações na caquexia é o estabelecimento do estado inflamatório crônico (Baracos *et al.*, 2018; Paval *et al.*, 2022). Diante disso, estudos prévios, pré-clínicos, verificaram que as citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-8 e IL-1 β , podem causar alterações fenotípicas graves nos elementos contráteis do citoesqueleto e na mitocôndria de cardiomiócitos e que essas mesmas citocinas foram encontradas elevadas em camundongos com o desenvolvimento do adenocarcinoma de colórectal C26 (Buoncervello *et al.*, 2019). Assim como em outros estudos, no modelo de carcinossarcoma de Walker-256, desenvolvido em ratos, encontrou-se perfil

semelhante devido ao aumento sérico das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-6 e IFN- γ (Cruz et al, 2017).

No presente trabalho, quantificamos ambas as citocinas, IL-1 β e IL-10, pró e anti-inflamatórias, respectivamente, que apresentaram concentrações maiores no líquido ascítico proveniente de ratos com tumor de Walker-256 em relação ao líquido ascítico inativado, sugerindo que a elevação da temperatura degradou parcialmente estas citocinas. Entretanto, o líquido ascítico inativado ainda apresentou, porém em menor proporção, certa quantidade destas citocinas (redução de 27% de IL-1 e de 62% de IL-10). Esses dados são coerentes com os verificados por Buoncervello e colaboradores, que apontam que a citocina pro-inflamatória IL-1 β pode ser um indutor de danos cardíacos (Buoncervello *et al.*, 2019). A IL-1 β foi associada diretamente à perda de peso e à perda muscular em pacientes com câncer (Scheede-Bergdahl *et al.*, 2012). Além disso, a IL-1 β desempenha papel crucial na resposta do tecido cardíaco, contribuindo para vários efeitos deletérios, como aumentar a infiltração de células do sistema imune no tecido cardíaco, causando assim aumento da deposição de matriz colágena extracelular e com isso fibrose, além de induzir apoptose das células cardíacas, e indiretamente comprometendo a capacidade de contratilidade cardíaca (Mitchell *et al.*, 2007; Rose, 2011; Shen, Qin, Bu, 2015; Kraft *et al.*, 2019). Por outro lado, em relação ao soro de ratos caquéticos portadores do mesmo modelo tumoral, foi encontrado tendência à elevação (cerca de 10 vezes maior; $p=0,07$) da IL-1 β em relação aos animais saudáveis, além do aumento significativo da IL-10 (cerca de 48 vezes maior) em relação aos animais saudáveis. Esses dados foram concordantes aos achados de Cruz e Gomes-Marcondes, onde observaram elevação significativa de citocinas pro-inflamatórias (TNF α , IL-6, além do aumento da razão TNF α /IL-10) neste mesmo modelo tumoral (Cruz et al, 2017). Ainda assim, o líquido ascítico apresentou concentrações dessas citocinas maiores que os soros dos animais caquéticos (cerca de 4 vezes maior a IL-1 β , e 1,5 vezes maior da IL-10). A IL-10 é umas das citocinas mais frequentemente estudada e considerada como um dos mediadores anti-inflamatórios da caquexia do câncer, desempenhando papel importante na modulação do processo inflamatório cardíaco, especialmente em situações de lesão e inflamação na insuficiência cardíaca, pois pode inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 β e IL-6, minimizando danos celulares, além de reduzir apoptose dos cardiomiócitos, modulando também o estresse oxidativo cardíaco (Dhingra *et al.*, 2007; Kaur *et al.*, 2006, 2009; Luiz *et al.*, 2009; Bartekova *et al.*, 2018). Além disso, a IL-10 pode ativar a STAT3, que desempenha papéis importantes na regulação da sobrevivência celular, proliferação, diferenciação e resposta inflamatória, entre outros processos (Grivennikov, Karin, 2010; da Fonseca *et al.*, 2020). Embora, em pacientes, o

aumento da IL-10 não foi associado à perda de peso, em alguns casos, foi associado à baixa sobrevida de pacientes com câncer de pâncreas. Além disso, é importante considerar que o nível circulante de citocinas, pró-inflamatórias ou anti-inflamatórias, pode variar de acordo com o modelo tumoral e servir como biomarcador para o prognóstico e o direcionamento de opções de tratamentos (Feng *et al.*, 2018; Paval *et al.*, 2022), além de variar de acordo com o avanço da doença e respostas individuais do hospedeiro (Cruz, Oliveira, Gomes-Marcondes, 2017).

Diante disso, a maior concentração das citocinas presentes no líquido ascítico comparativamente ao soro de ratos caquéticos, sugere que o líquido ascítico possivelmente seja mais agressivo para as células, fato esse que reforça o modelo experimental I de indução de caquexia em cardiomioblastos. Entretanto, o líquido ascítico inativado, apesar de ter menores concentrações destas citocinas, ainda assim superior à dos ratos caquéticos, não apresentou danos significativos às células cardíacas. Nesse sentido, devido ao fato do líquido ascítico inativado ter apresentado efeitos às células tão semelhantes ao do grupo controle (onde é possível ter concentração de citocinas muito baixa, como verificamos no soro dos animais saudáveis), podemos considerar que mais fatores nocivos podem ter sido degradados com a elevação da temperatura, potencialmente incluindo outras citocinas pro-inflamatórias e fatores tumorais, como o do Fator Walker (Yano *et al.*, 2008).

No entanto, para ter uma visão mais abrangente do que mais poderia influenciar as respostas celulares, foi feita análise metabolômica das amostras, mostrando que o processo de inativação também alterou alguns metabólitos, aumentando as concentrações de dimetilamina e piruvato, e diminuindo o teor de glicina, lactato e citrato, o que pode ter favorecido o aumento na atividade de vias metabólicas relacionadas à produção de energia. Nesse sentido, o piruvato em maior concentração no líquido ascítico inativado – I – pode ter favorecido o metabolismo mitocondrial, direcionando-o para o metabolismo oxidativo, com maior produção de ATP, sugerindo então que mesmo na presença de alguns fatores ou até mesmo a variação de concentração de metabólitos tenha favorecido o metabolismo celular, mantendo sua atividade mitocondrial semelhante ao grupo controle. Comparativamente, a maior concentração de lactato e glicina presente no líquido ascítico – A – pode ter interferido no metabolismo energético das células cardíacas, influenciando e diminuindo a produção de ATP e como consequência causar aumento do estado glicolítico.

Diante disso, ao analisarmos o primeiro modelo experimental, os resultados sugerem que o líquido ascítico – A – pode ter comprometido a atividade mitocondrial por diminuir a viabilidade celular e também diminuir as proteínas do complexo II, a succinato desidrogenase, da cadeia transportadora de elétrons, possivelmente afetando o potencial de membrana

mitocondrial, além de apresentar tendencia na diminuição dos parâmetros da respiração celular. Apesar dos complexos I, III e V não terem apresentado diferença estatística, todos seguiram a mesma tendencia de diminuição, com porcentagem muito próxima da diferença observada no complexo II. Sabendo que as proteínas do complexo OXPHOS desempenham papel fundamental para a manutenção da função mitocondrial e produção de energia nas células, e nesse estudo em particular para as células cardíacas, a diminuição do complexo II possivelmente afetou a produção de ATP, pois exerce conexão direta com o ciclo do ácido tricarboxílico e cadeia de transporte de elétrons; assim, associado à tendencia de redução do complexos I, III e V, correspondendo à alteração no bombeamento de prótons, consequentemente do seu gradiente e diminuição da atividade da ATP sintase, provavelmente alterou a função celular, assim como aumentando a produção de espécies reativas de oxigênio (Lee *et al.*, 2021). Nesse contexto, como já apontado anteriormente, a caquexia cardíaca é caracterizada pela perda de massa muscular, inclusive do músculo cardíaco, conforme estudos prévios do Laboratório de Nutrição e Câncer em modelo pré-clínico (Toneto *et al.*, 2016), e disfunção mitocondrial, como verificada em outros estudos e aqui no presente trabalho (Berent *et al.*, 2019; Cruz *et al.*, 2020).

Adicionalmente, outras proteínas também relacionadas à mitocôndria como a mitofusina 2, citocromo c e UCP3, e proteínas relacionadas às vias autofágica e de danos cardíacos, como LC3 A/B e Troponina I respectivamente, também tenderam a diminuir, apresentando porcentagens consideráveis de diferença no grupo A em relação ao grupo C, pois os valores de p correspondiam a significância de 10%. A Mfn2 (mitofusina 2), proteína localizada na membrana mitocondrial externa, desempenha papel na regulação da dinâmica mitocondrial, incluindo a fusão mitocondrial, a manutenção da morfologia mitocondrial e a interação entre mitocôndrias e o retículo endoplasmático (Chandhok, Lazarou, Neumann, 2018), assim a tendencia de redução, de certo modo, está em consonância com as alterações dos complexos OXPHOS. A alteração da Mfn2 está associada à redução na atividade dos complexos OXPHOS, levando à menor capacidade de produção de ATP, além disso pode resultar em fragmentação mitocondrial, prejudicando a eficiência da mitocôndria reduzindo também, o potencial de membrana mitocondrial (Pich *et al.*, 2005). Nesse sentido, a disfunção de Mfn2 pode levar à redução na eficiência da cadeia de transporte de elétrons, produção insuficiente de ATP, aumento da produção de EROs e, consequentemente, a disfunção mitocondrial, contribuindo para condições patológicas como a caquexia cardíaca. A proteína UCP3 é conhecida como uma das proteínas desacopladoras (UCPs) com a função de transportar ânions mitocondriais, e dessa forma minimizar a produção de EROs pela cadeia de transporte

de elétrons. Para isso, credita-se que a UCP3 seja geralmente ativada por EROs para induzir o vazamento de prótons (Mailloux; Harper, 2011), sendo assim, num contexto em que houve alta produção de EROs, é esperado aumento desta proteína, o que contradiz com a tendência do resultado aqui apresentado. Porém sua função ainda não está bem estabelecida, outros resultados argumentam contra o papel protetor da UCP3, pois estudo de Nabben e colaboradores não encontrou evidências de que a função da UCP3 seja de desacoplamento basal ou regulação da produção de EROs (Nabben *et al.*, 2011). Entretanto, alguns dados sugerem que a UCP3 é crucial na prevenção de arritmias associadas à morte cardíaca súbita sob condições de estresse cardíaco que envolvem desafio lipídicos como insuficiência cardíaca (Nabben *et al.*, 2014). A LC3 é umas das proteínas centrais na sinalização da autofagia sendo considerada biomarcador regulado positivamente e um dos principais responsáveis pela alta taxa de degradação proteica no coração caquético (Rausch *et al.*, 2021; Bagnall *et al.*, 2023). O citocromo c, além de apresentar função nas mitocôndrias e estar relacionado à síntese de ATP, pois ele age na detoxificação de EROs da cadeia transportadora de elétrons, também atua na sinalização de vias apoptóticas (Ow *et al.*, 2008). Contrariamente ao esperado, que seria o aumento da LC3 A/B e do citocromo c (de Castro *et al.*, 2019), a tendência à diminuição dessas proteínas, que estão relacionadas à autofagia e apoptose, não está bem clara, mas pode possivelmente afetar a capacidade de remoção das mitocôndrias danificadas e outras organelas, aumentando o acúmulo de componentes celulares não funcionais ou tóxicos, e assim aumentar a produção de EROs. Por outro lado, a diminuição do citocromo c pode influenciar diretamente na formação excessiva de EROs e dessa forma levar a morte celular através do mecanismo de necrose celular, em função do estresse oxidativo (Abrigo *et al.*, 2018). Nesse sentido, a diminuição da Mfn2, LC3 A/B e citocromo c e UCP3 em células cardíacas poderia resultar em uma cascata de disfunções que afetaram a produção de energia, aumentam o estresse oxidativo, comprometeram a capacidade de manutenção celular, provavelmente através de processos em paralelo a ativação das vias de morte celular. No entanto, essas vias merecem atenção, principalmente, considerando o fato de que as mitocôndrias demonstram ser alvo importante para a terapia direta da melhoria da função cardíaca, pois sua disfunção está associada à complicações da insuficiência cardíaca (Brown *et al.*, 2017) e estão alteradas em outros modelos de caquexia cardíaca relacionadas ao câncer (Berent *et al.*, 2019; Lee *et al.*, 2021). Por fim, a alteração da troponina I pode indicar danos cardíaco, pois é a subunidade que regula a contração muscular no coração ao interagir com a actina e a miosina em resposta ao cálcio (Solaro; Rosevear; Kobayashi, 2008). A troponina I depende da energia mitocondrial; e com a disfunção de Mfn2 comprometendo a produção de ATP, a sua possível redução, como

verificada nesse estudo tendência do seu decréscimo nas células expostas ao líquido ascítico – A – possivelmente afeta a contração muscular cardíaca. Por outro lado, mitofagia além do estresse oxidativo possivelmente podem ter influenciado a manutenção, renovação e mais especificamente degradação das proteínas contráteis, incluindo a troponina I. Estudos mostraram que a troponina I também está alterada na caquexia em camundongos portadores de C26 e também associada à diversas alterações como função cardíaca diminuída, com aumento de fibrose, ruptura da estrutura miocárdica e alteração da composição das proteínas contráteis (Tian *et al.*, 2011), portanto, também merece atenção e melhores investigações.

No segundo modelo, em que usamos o soro de animais caquéticos, optamos por diferenciar as células a fim de analisar como os fatores tumorais podem afetar as células com perfis mais semelhantes ao cardiomiócito adulto. Uma das vantagens é que esse modelo nos permitiu fazer análises morfológicas para verificarmos possíveis alterações no conteúdo do citoesqueleto como verificado em estudos anteriores (Buoncervello *et al.*, 2019; Cosper; Leinwand, 2011; Tian *et al.*, 2011). Além disso, neste modelo entramos com a proposta de tratamento com a suplementação com leucina, já que estudos mostram que a administração de BCAAs, como suplemento alimentar, estimula positivamente a síntese proteica, além de inibir o processo catabólico (Anthony *et al.*, 2000; Ventrucci *et al.*, 2004; Mello; Gomes-Marcondes, 2007; Wilson *et al.*, 2010), e mais especificamente, a leucina apresenta destacada função no metabolismo de proteínas, já que a infusão com níveis fisiológicos de leucina estimulou a síntese proteica no músculo esquelético, assim como do músculo cardíaco (Escobar *et al.*, 2006; Toneto *et al.*, 2016).

Foi observado que as células não diferenciadas ou em processo de diferenciação apresentaram-se mais responsivas ao soro de animal caquético portador de tumor de Walker-256, o que dificultou em parte o estabelecimento do protocolo e a quantidade de testes para padronizarmos o modelo. Sendo assim, após a padronização e estabelecimento do protocolo de diferenciação, foi observado que nas análises de viabilidade celular, 5% do soro W não afetou as células, como observado em testes anteriores, mas apresentou tendência em diminuir a maioria dos parâmetros da respiração celular, apresentando perfil de resposta muito semelhante ao líquido ascítico em células não diferenciadas. As porcentagens de diferença na respiração celular entre os grupos C e W, verificadas no segundo modelo experimental, foram similares às respostas entre os grupos C e A no modelo I. Assim, foi possível caracterizar dois modelos de resposta aos fatores tumorais e citocinas presentes no soro caquético, assim como no líquido ascítico. Como já abordado acima, tanto as citocinas pró-inflamatórias como os fatores

tumorais, descritos na literatura como fator de indução de proteólise (PIF), ou por nós verificado que o fator Walker, causam alterações celulares importantes promovendo alteração na viabilidade celular, assim como alteração no perfil metabolômico e proteômico das células musculares (Cruz *et al.*, 2020; Viana *et al.*, 2016), sendo que o achado principal desses estudos corresponde à alteração da atividade mitocondrial. As análises de imunofluorescência não sugeriram alterações morfológicas, apenas possível diminuição da miosina nas células expostas ao soro W, onde fizemos apenas análise qualitativa, por inspeção visual. Entretanto, esses resultados estão em consonância com vários estudos que mostram que a caquexia (de forma indireta, utilizando-se o soro de animal caquético ou o líquido ascítico) causam degradação da proteína estrutural contrátil miosina, e aqui também avaliado a actina (resultados da imunofluorescência).

A facilidade e a velocidade em efetuar experimentos no modelo I, onde foram utilizados cardiomioblastos expostos ao líquido ascítico, permitiu maior número de análise e como consequência explorar mais as vias relacionadas à atividade mitocondrial. O fato da viabilidade estar comprometida, e o complexo II diminuído, além das outras proteínas seguirem a mesma tendência, mostrou-nos a eficiência desse modelo experimental. O segundo modelo II, mais complexo e robusto, e com a vantagem de também propormos tratamento com leucina, apresentou a mesma tendência nas análises efetuadas em comum com as do modelo I. Entretanto, o tratamento com a leucina não demonstrou interferir nas respostas das células W apesar de ter aumentado a viabilidade das células C. Em estudos prévios a leucina demonstrou efeitos muito positivos em células C₂C₁₂ em concentrações muito menores (50µM) (Cruz *et al.*, 2020). Porém, como a caquexia afeta de maneira diferente o tecido cardíaco (Shum *et al.*, 2015; Rausch *et al.*, 2021), talvez seriam melhores outras estratégias para este modelo, como por exemplo aumentar o tempo de tratamento, visto que a elevação das concentrações de leucina pode não ser a solução; como apresentado aqui nesse estudo, as maiores concentrações testadas não provocaram efeitos adicionais, como também manteve a estabilidade da viabilidade celular. Além disso, em trabalho pré-clínico houve melhora do tecido cardíaco sob influência da dieta rica em leucina na concentração de 3%, assim como melhora das vias de sinalização no músculo esquelético (Toneto *et al.*, 2016).

Considerando as alterações relacionadas às vias mitocondriais, é importante considerarmos que a leucina, como aminoácido de cadeia ramificada, é um dos compostos que agem no metabolismo energético das células, na modulação da inflamação e no estresse oxidativo (Cruz *et al.*, 2020; Cruz, Oliveira, Gomes-Marcondes, 2017; Viana *et al.*, 2016), mas para maior conhecimento sobre esses efeitos no coração, mais estudos são necessários.

9. Conclusão

Os resultados, até aqui obtidos, permitem-nos compreender algumas alterações celulares em respostas ao câncer, principalmente em relação às atividades mitocondriais, possivelmente relacionadas aos mecanismos energéticos em células cardíacas. Sendo assim, os dois modelos experimentais, aqui propostos, podem servir para simular *in vitro* o desenvolvimento da caquexia cardíaca, verificado em modelos pré-clínicos e também na clínica. Ambos apresentaram limitações, mas através delas e da comparação entre os modelos é possível elaborar propostas de aperfeiçoamento para melhor direcionamento de estudos futuros. Em relação à leucina, o número de análise realizada não nos permitiu concluir, nas condições estudadas, sobre sua eficácia no tecido cardíaco, mas é importante ainda considerar seus efeitos positivos baseados em estudos anteriores, já que não apresentou efeito negativo em nenhuma das análises aqui realizada.

10. Referências Bibliográficas

ABRIGO, Johanna *et al.*, Role of oxidative stress as key regulator of muscle wasting during cachexia. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, [s. l.], v. 2018, 2018.

ANKER, Markus S. *et al.*, Advanced cancer is also a heart failure syndrome: a hypothesis. **European Journal of Heart Failure**, [s. l.], v. 23, n. 1, p. 140–144, 2021.

ANTHONY, J C *et al.*, Leucine stimulates translation initiation in skeletal muscle of postabsorptive rats via a rapamycin-sensitive pathway. **The Journal of nutrition**, [s. l.], v. 130, n. 10, p. 2413–2419, 2000.

ARGILÉS, Josep M. *et al.*, Cancer cachexia: Understanding the molecular basis. **Nature Reviews Cancer**, [s. l.], v. 14, n. 11, p. 754–762, 2014.

ARGILÉS, Josep M. *et al.*, Inter-tissue communication in cancer cachexia. **Nature Reviews Endocrinology**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 9–20, 2019.

ARGILÉS, Josep M.; BUSQUETS, Sílvia; LÓPEZ-SORIANO, Francisco Javier. Cancer cachexia, a clinical challenge. **Current Opinion in Oncology**, [s. l.], v. 31, n. 4, p. 286–290, 2019.

ATTAIX, Didier *et al.*, Ubiquitin-proteasome-dependent proteolysis in skeletal muscle. **Reproduction Nutrition Development**, [s. l.], v. 38, n. 2, p. 153–165, 1998.

BAGNALL, Lisa *et al.*, Biomarkers and mechanisms associated with cancer-induced cardiac cachexia: A systematic review. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, [s. l.], v. 14, n. 4, p. 1900–1905, 2023.

BARACOS, Vickie E. *et al.*, Cancer-associated cachexia. **Nature Reviews Disease Primers**, [s. l.], v. 4, n. 1, 2018.

BARKHUDARYAN, Anush *et al.*, Cardiac muscle wasting in individuals with cancer cachexia. **ESC Heart Failure**, [s. l.], v. 4, n. 4, p. 458–467, 2017.

BARTEKOVA, Monika *et al.*, **Role of cytokines and inflammation in heart function during health and disease**. [S. l.]: Springer New York LLC, 2018.

BERENT, Taylor E. *et al.*, Impaired cardiac performance, protein synthesis, and mitochondrial function in tumor-bearing mice. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 14, n. 12, p. e0226440, 2019.

BOER, Rudolf A. de *et al.*, Common mechanistic pathways in cancer and heart failure. A scientific roadmap on behalf of the Translational Research Committee of the Heart Failure Association (HFA) of the European Society of Cardiology (ESC). **European Journal of Heart Failure**, [s. l.], v. 22, n. 12, p. 2272–2289, 2020.

BOERMA, Marjan *et al.*, Effects of ionizing radiation on the heart. **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, [s. l.], v. 770, p. 319–327, 2016.

BORGES, F. H. *et al.*, Oxidative and proteolytic profiles of the right and left heart in a model of cancer-induced cardiac cachexia. **Pathophysiology**, [s. l.], v. 21, n. 4, p. 257–265, 2014.

BOSSI, Paolo *et al.*, The spectrum of malnutrition/cachexia/sarcopenia in oncology according to different cancer types and settings: A narrative review. **Nutrients**, [s. l.], v. 13, n. 6, p. 1980, 2021.

BRANCO, Ana F. *et al.*, Gene expression profiling of H9c2 myoblast differentiation towards a cardiac-like phenotype. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 10, n. 6, p. e0129303, 2015.

BRANCO, Ana F. *et al.*, Isoproterenol cytotoxicity is dependent on the differentiation state of the cardiomyoblast H9c2 cell line. **Cardiovascular Toxicology**, [s. l.], v. 11, n. 3, p. 191–203, 2011.

BROWN, David A. *et al.*, Expert consensus document: Mitochondrial function as a therapeutic target in heart failure. **Nature Reviews Cardiology**, [s. l.], v. 14, n. 4, p. 238–250, 2017.

BROWN, Jacob L. *et al.*, Protein imbalance in the development of skeletal muscle wasting in tumour-bearing mice. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, [s. l.], v. 9, n. 5, p. 987–1002, 2018.

BUONCERVELLO, Maria *et al.*, Inflammatory cytokines associated with cancer growth induce mitochondria and cytoskeleton alterations in cardiomyocytes. **Journal of Cellular Physiology**, [s. l.], v. 234, n. 11, p. 20453–20468, 2019.

CAO, Zhipeng *et al.*, Biomarkers for cancer cachexia: A mini review. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 22, n. 9, 2021.

CHANDHOK, Gursimran; LAZAROU, Michael; NEUMANN, Brent. Structure, function, and regulation of mitofusin-2 in health and disease. **Biological Reviews**, [s. l.], v. 93, n. 2, p. 933–949, 2018.

CONG, Minghua *et al.*, The patient-generated subjective global assessment is a promising screening tool for cancer cachexia. **BMJ Supportive and Palliative Care**, [s. l.], v. 12, n. e1, p. E39–E46, 2020.

COSPER, Pippa F.; LEINWAND, Leslie A. Cancer causes cardiac atrophy and autophagy in a sexually dimorphic manner. **Cancer Research**, [s. l.], v. 71, n. 5, p. 1710–1720, 2011.

COSTELLI, P. *et al.*, Activation of Ca²⁺-dependent proteolysis in skeletal muscle and heart in cancer cachexia. **British Journal of Cancer**, [s. l.], v. 84, n. 7, p. 946–950, 2001.

CRUZ, Bread Leandro Gomes *et al.*, Dietary leucine supplementation minimises tumour-induced damage in placental tissues of pregnant, tumour-bearing rats. **BMC Cancer**, [s. l.], v. 16, n. 1, 2016.

CRUZ, Bread *et al.*, Leucine-rich diet modulates the metabolomic and proteomic profile of skeletal muscle during cancer cachexia. **Cancers**, [s. l.], v. 12, n. 7, p. 1–25, 2020.

CRUZ, Bread; GOMES-MARCONDES, Maria Cristina Cintra. Leucine-rich diet supplementation modulates foetal muscle protein metabolism impaired by Walker-256 tumour. **Reproductive biology and endocrinology: RB&E**, [s. l.], v. 12, p. 2, 2014.

CRUZ, Bread; OLIVEIRA, André; GOMES-MARCONDES, Maria Cristina Cintra. L-leucine dietary supplementation modulates muscle protein degradation and increases pro-inflammatory cytokines in tumour-bearing rats. **Cytokine**, [s. l.], v. 96, p. 253–260, 2017.

DA FONSECA, Guilherme Wesley Peixoto *et al.*, Cancer cachexia and related metabolic dysfunction. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 21, n. 7, p. 2321, 2020.

DE CASTRO, Gabriela S. *et al.*, Human cachexia induces changes in mitochondria, autophagy and apoptosis in the skeletal muscle. **Cancers**, [s. l.], v. 11, n. 9, 2019.

DEMINICE, Rafael *et al.*, Creatine supplementation prevents hyperhomocysteinemia, oxidative stress and cancer-induced cachexia progression in Walker-256 tumor-bearing rats. **Amino Acids**, [s. l.], v. 48, n. 8, p. 2015–2024, 2016.

DEPRE, Christophe *et al.*, Unloaded heart in vivo replicates fetal gene expression of cardiac hypertrophy. **Nature medicine**, [s. l.], v. 4, n. 11, p. 1269–1275, 1998.

DHINGRA, Sanjiv *et al.*, p38 and ERK1/2 MAPKs mediate the interplay of TNF-and IL-10 in regulating oxidative stress and cardiac myocyte apoptosis. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, [s. l.], v. 293, p. 3524–3531, 2007.

DOLLY, Adeline; DUMAS, Jean François; SERVAIS, Stéphane. Cancer cachexia and skeletal muscle atrophy in clinical studies: what do we really know?. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, [s. l.], v. 11, n. 6, p. 1413–1428, 2020.

EMERY, Peter W. Cachexia in Experimental Models. **Nutrition**, [s. l.], v. 15, n. 7–8, p. 600–603, 1999.

ESCOBAR, Jeffery *et al.*, Regulation of cardiac and skeletal muscle protein synthesis by individual branched-chain amino acids in neonatal pigs. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, [s. l.], v. 290, n. 4, p. E612-21, 2006.

EWER, M S. Cardiotoxicity of anticancer treatments. **Nature Reviews Cardiology**, [s. l.], v. 12, n. 9, p. 547–558, 2015.

FEARON, Kenneth *et al.*, Definition and classification of cancer cachexia: an international consensus. **The lancet oncology**, [s. l.], v. 12, n. 5, p. 489–95, 2011.

FENG, Lanyun *et al.*, Serum levels of IL-6, IL-8, and IL-10 are indicators of prognosis in pancreatic cancer. **Journal of International Medical Research**, [s. l.], v. 46, n. 12, p. 5228–5236, 2018.

FERREIRA DE SOUZA, Thiago *et al.*, Anthracycline Therapy Is Associated With Cardiomyocyte Atrophy and Preclinical Manifestations of Heart Disease. **JACC: Cardiovascular Imaging**, [s. l.], v. 11, n. 8, p. 1045–1055, 2018.

FREITAS, J J *et al.*, Walker-256 tumor growth causes oxidative stress in rat brain. **Journal of neurochemistry**, [s. l.], v. 77, n. 2, p. 655–63, 2001.

GOMES-MARCONDES MCC. **Influência da gestação sobre o crescimento do câncer e deste sobre o desenvolvimento feto-placentário**. 1994. - Universidade de São Paulo, São Paulo, 1994.

GONÇALVES, Estela Maria; SALOMÃO, Emilianne Miguel; GOMES-MARCONDES, Maria Cristina Cintra. Leucine modulates the effect of Walker factor, a proteolysis-inducing factor-like protein from Walker tumours, on gene expression and cellular activity in C2C12 myotubes. **Cytokine**, [s. l.], v. 64, n. 1, p. 343–350, 2013.

GOTO, Kei *et al.* Berberine Improves Cancer-Derived Myocardial Impairment in Experimental Cachexia Models by Targeting High-Mobility Group Box-1. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 25, n. 9, 2024.

GRIVENNIKOV, Sergei I.; KARIN, Michael. Dangerous liaisons: STAT3 and NF- κ B collaboration and crosstalk in cancer. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 11–19, 2010.

GUO, Ying *et al.*, Prognostic Value of Heart Rate Variability in Patients With Cancer. **Journal of Clinical Neurophysiology**, [s. l.], v. 32, n. 6, p. 516–520, 2015.

GUZZETTI, Stefano *et al.*, First diagnosis of colorectal or breast cancer and prevalence of atrial fibrillation. **Internal and Emergency Medicine**, [s. l.], v. 3, n. 3, p. 227–231, 2008.

HAN, H. Q.; MITCH, William E. Targeting the myostatin signaling pathway to treat muscle wasting diseases. **Current Opinion in Supportive and Palliative Care**, [s. l.], v. 5, n. 4, p. 334–341, 2011.

HINCH, E. C.A. *et al.*, Disruption of pro-oxidant and antioxidant systems with elevated expression of the ubiquitin proteasome system in the cachectic heart muscle of nude mice. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, [s. l.], v. 4, n. 4, p. 287–293, 2013.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER - INCA. **O que é câncer?**. [S. l.], 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/o-que-e-cancer>.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER / MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Estimativa | 2023 Incidência de Câncer no Brasil**. [S. l.: s. n.], 2022. Disponível em: <chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcgclefindmkaj/https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/estimativa-2023.pdf>.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA / MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Estimativa | 2020 Incidência de Câncer no Brasil**. [S. l.: s. n.], 2019. Disponível em: <chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcgclefindmkaj/https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). **Latest global cancer data: Cancer burden rises to 18.1 million new cases and 9.6 million cancer deaths in 2018**. [S. l.: s. n.], 2018. Disponível em: <https://www.iarc.who.int/featured-news/latest->

global-cancer-data-cancer-burden-rises-to-18-1-million-new-cases-and-9-6-million-cancer-deaths-in-2018/.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). **Latest global cancer data: Cancer burden rises to 19.3 million new cases and 10.0 million cancer deaths in 2020.** [S. l.: s. n.], 2020. Disponível em: <https://www.iarc.who.int/news-events/latest-global-cancer-data-cancer-burden-rises-to-19-3-million-new-cases-and-10-0-million-cancer-deaths-in-2020/>.

JOHNS, Neil *et al.*, Clinical classification of cancer cachexia: Phenotypic correlates in human skeletal muscle. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. e83618, 2014.

KAREKAR, Priyanka *et al.*, Tumor-induced cardiac dysfunction: A potential role of ros. **Antioxidants**, [s. l.], v. 10, n. 8, p. 1299, 2021.

KAUR, Kuljeet *et al.*, Biology of TNF α and IL-10, and their imbalance in heart failure. **Heart Failure Reviews**, [s. l.], v. 14, n. 2, p. 113–123, 2009.

KAUR, Kuljeet *et al.*, Interplay of TNF- α and IL-10 in regulating oxidative stress in isolated adult cardiac myocytes. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, [s. l.], v. 41, n. 6, p. 1023–1030, 2006.

KHAL, J. *et al.*, Increased expression of proteasome subunits in skeletal muscle of cancer patients with weight loss. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, [s. l.], v. 37, n. 10, p. 2196–2206, 2005.

KRAFT, Lisa *et al.*, Blocking the IL-1 β signalling pathway prevents chronic viral myocarditis and cardiac remodeling. **Basic Research in Cardiology**, [s. l.], v. 114, n. 2, 2019.

LAW, Michelle L.; METZGER, Joseph M. Cardiac myocyte intrinsic contractility and calcium handling deficits underlie heart organ dysfunction in murine cancer cachexia. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 23627, 2021.

LEE, David E. *et al.*, Cancer-induced cardiac atrophy adversely affects myocardial redox state and mitochondrial oxidative characteristics. **JCSM Rapid Communications**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 3–15, 2021. Disponível em: Acesso em: 22 fev. 2021.

LENA, Alessia *et al.*, Clinical and Prognostic Relevance of Cardiac Wasting in Patients With Advanced Cancer. **Journal of the American College of Cardiology**, [s. l.], v. 81, n. 16, p. 1569–1586, 2023.

LUIZ, Miguel *et al.*, Anti-inflammatory Effect of Physical Training in Heart Failure: Role of TNF- α and IL-10. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, [s. l.], v. 93, p. 692–700, 2009.

MAILLOUX, Ryan J.; HARPER, Mary Ellen. Uncoupling proteins and the control of mitochondrial reactive oxygen species production. **Free Radical Biology and Medicine**, [s. l.], v. 51, n. 6, p. 1106–1115, 2011.

MANNE, Nandini D.P.K. *et al.*, Altered cardiac muscle mTOR regulation during the progression of cancer cachexia in the ApcMin/+ mouse. **International Journal of Oncology**, [s. l.], v. 42, n. 6, p. 2134–2140, 2013.

MCDONALD, James *et al.*, Physical function endpoints in cancer cachexia clinical trials: Systematic Review 1 of the cachexia endpoints series. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, [s. l.], v. 14, n. 5, p. 1932–1948, 2023.

MISHRA, Sneha *et al.*, Subcutaneous Ehrlich Ascites Carcinoma mice model for studying cancer-induced cardiomyopathy. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 1–11, 2018.

MITCHELL, M Darren *et al.*, IL-1 stimulates rat cardiac fibroblast migration via MAP kinase pathways. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, [s. l.], v. 292, p. 1139–1147, 2007.

MURPHY, Kate T. The pathogenesis and treatment of cardiac atrophy in cancer cachexia. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, [s. l.], v. 310, n. 4, p. H466–H477, 2016.

MUSOLINO, Vincenzo *et al.*, Megestrol acetate improves cardiac function in a model of cancer cachexia-induced cardiomyopathy by autophagic modulation. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, [s. l.], v. 7, n. 5, p. 555–566, 2016.

NABBEN, Miranda *et al.*, Lack of UCP3 does not affect skeletal muscle mitochondrial function under lipid-challenged conditions, but leads to sudden cardiac death. **Basic Research in Cardiology**, [s. l.], v. 109, n. 6, 2014.

NABBEN, Miranda *et al.*, Uncoupled respiration, ROS production, acute lipotoxicity and oxidative damage in isolated skeletal muscle mitochondria from UCP3-ablated mice. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, [s. l.], v. 1807, n. 9, p. 1095–1105, 2011.

NI, Jun; ZHANG, Li. Cancer cachexia: Definition, staging, and emerging treatments. **Cancer Management and Research**, [s. l.], v. 12, p. 5597–5605, 2020.

NUKAGA, Shota *et al.*, Combined administration of lauric acid and glucose improved cancer-derived cardiac atrophy in a mouse cachexia model. **Cancer Science**, [s. l.], v. 111, n. 12, p. 4605–4615, 2020.

ONÓDI, Zsófia *et al.*, Systematic transcriptomic and phenotypic characterization of human and murine cardiac myocyte cell lines and primary cardiomyocytes reveals serious limitations and low resemblances to adult cardiac phenotype. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, [s. l.], v. 165, p. 19–30, 2022.

OW, Yong Ling P. *et al.*, Cytochrome c: Functions beyond respiration. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [s. l.], v. 9, n. 7, p. 532–542, 2008.

PADILHA, Camila Souza *et al.*, Resistance exercise attenuates skeletal muscle oxidative stress, systemic pro-inflammatory state, and cachexia in Walker-256 tumor-bearing rats. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, [s. l.], v. 42, n. 9, p. 916–923, 2017.

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

PENNA, Fabio; BUSQUETS, Sílvia; ARGILÉS, Josep M. Experimental cancer cachexia: Evolving strategies for getting closer to the human scenario. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, [s. l.], v. 54, p. 20–27, 2016.

PEOPLES, Jessica N. *et al.*, Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in heart disease. **Experimental and Molecular Medicine**, [s. l.], v. 51, n. 12, p. 1–13, 2019.

PICH, Sara *et al.*, The Charcot-Marie-Tooth type 2A gene product, Mfn2, up-regulates fuel oxidation through expression of OXPHOS system. **Human Molecular Genetics**, [s. l.], v. 14, n. 11, p. 1405–1415, 2005.

POISSON, Johanne *et al.*, Prevalence and prognostic impact of cachexia among older patients with cancer: a nationwide cross-sectional survey (NutriAgeCancer). **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, [s. l.], v. 12, n. 6, p. 1477–1488, 2021.

RAUSCH, Valentina *et al.*, Understanding the common mechanisms of heart and skeletal muscle wasting in cancer cachexia. **Oncogenesis**, [s. l.], v. 10, n. 1, 2021.

ROSE, Noel R. Critical cytokine pathways to cardiac inflammation. **Journal of Interferon and Cytokine Research**, [s. l.], v. 31, n. 10, p. 705–710, 2011.

SANDRI, Marco. Protein breakdown in cancer cachexia. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, [s. l.], v. 54, p. 11–19, 2016.

SCHEEDE-BERGDAHL, Celena *et al.*, Is IL-6 the best pro-inflammatory biomarker of clinical outcomes of cancer cachexia?. **Clinical Nutrition**, [s. l.], v. 31, n. 1, p. 85–88, 2012.

SCHMIDT, Søren Fisker *et al.*, Cancer Cachexia: More Than Skeletal Muscle Wasting. **Trends in Cancer**, [s. l.], v. 4, n. 12, p. 849–860, 2018.

SEVIIRI, Mathias *et al.*, Resting heart rate, temporal changes in resting heart rate, and overall and cause-specific mortality. **Heart**, [s. l.], v. 104, n. 13, p. 1076–1085, 2018.

SHEN, Yi; QIN, Jie; BU, Peili. Pathways involved in interleukin-1 β -mediated murine cardiomyocyte apoptosis. **Texas Heart Institute Journal**, [s. l.], v. 42, n. 2, p. 109–116, 2015.

SHUM, Angie M.Y. *et al.*, Proteomic profiling of skeletal and cardiac muscle in cancer cachexia: Alterations in sarcomeric and mitochondrial protein expression. **Oncotarget**, [s. l.], v. 9, n. 31, p. 22001–22022, 2018.

SOLARO, R. John; ROSEVEAR, Paul; KOBAYASHI, Tomoyoshi. The unique functions of cardiac troponin I in the control of cardiac muscle contraction and relaxation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s. l.], v. 369, n. 1, p. 82–87, 2008.

SPRINGER, Jochen *et al.*, Prevention of liver cancer cachexia-induced cardiac wasting and heart failure. **European Heart Journal**, [s. l.], 2014.

SUNG, Hyuna *et al.*, Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, [s. l.], v. 71, n. 3, p. 209–249, 2021.

TAYLOR, Sean C.; LAPERRIERE, Genevieve; GERMAIN, Hugo. Droplet Digital PCR versus qPCR for gene expression analysis with low abundant targets: From variable nonsense to publication quality data. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 7, n. 1, 2017.

TIAN, Min *et al.*, Cardiac alterations in cancer-induced cachexia in mice. **International Journal of Oncology**, [s. l.], v. 37, n. 2, p. 347–353, 2010.

TIAN, Min *et al.*, Evidence for cardiac atrophic remodeling in cancer-induced cachexia in mice. **International Journal of Oncology**, [s. l.], v. 39, n. 5, p. 1321–1326, 2011.

TISDALE, Michael J. Are tumoral factors responsible for host tissue wasting in cancer cachexia?. **Future Oncology**, [s. l.], v. 6, n. 4, p. 503–513, 2010.

TISDALE, Michael J. Cachexia in cancer patients. **Nature Reviews Cancer**, [s. l.], v. 2, n. 11, p. 862–871, 2002.

TONETO, Aline Tatiane *et al.*, Nutritional leucine supplementation attenuates cardiac failure in tumour-bearing cachectic animals. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, [s. l.], v. 7, n. 5, p. 577–586, 2016.

TOTZECK, Matthias *et al.*, Heart failure from cancer therapy: can we prevent it?. **ESC Heart Failure**, [s. l.], v. 6, n. 4, p. 856–862, 2019.

VALE, C.; STEWART, L.; TIERNEY, J. Trends in UK cancer trials: Results from the UK Coordinating Committee for Cancer Research National Register of Cancer Trials. **British Journal of Cancer**, [s. l.], v. 92, n. 5, p. 811–814, 2005.

VENTRUCCI, G.; MELLO, M.A.R.; GOMES-MARCONDES, M.C.C. Leucine-rich diet alters the eukaryotic translation initiation factors expression in skeletal muscle of tumour-bearing rats. **BMC Cancer**, [s. l.], v. 7, 2007.

VENTRUCCI, G.; MELLO, M. A.R.; GOMES-MARCONDES, M. C.C. Proteasome activity is altered in skeletal muscle tissue of tumour-bearing rats fed a leucine-rich diet. **Endocrine-Related Cancer**, [s. l.], v. 11, n. 4, p. 887–895, 2004.

VIANA, Laís Rosa *et al.*, Leucine-rich diet alters the ¹H-NMR based metabolomic profile without changing the Walker-256 tumour mass in rats. **BMC Cancer**, [s. l.], v. 16, n. 1, 2016.

VON HAEHLING, Stephan; ANKER, Markus S.; ANKER, Stefan D. **Prevalence and clinical impact of cachexia in chronic illness in Europe, USA, and Japan: facts and numbers update 2016**. [S. l.]: Wiley Blackwell, 2016.

WILSON, Fiona A *et al.*, Stimulation of muscle protein synthesis by prolonged parenteral infusion of leucine is dependent on amino acid availability in neonatal pigs. **J Nutr**, [s. l.], v. 140, n. 2, p. 264–270, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **The top 10 causes of death**. [S. l.], 2020. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>.

Y SHUM, Angie M *et al.*, Cardiac and skeletal muscles show molecularly distinct responses to cancer cachexia. **Physiol Genomics**, [s. l.], v. 47, p. 588–599, 2015.

YANO, Claudia L. *et al.*, Metabolic and morphological alterations induced by proteolysis-inducing factor from Walker tumour-bearing rats in C2C12 myotubes. **BMC cancer**, [s. l.], v. 8, p. 1–11, 2008.

YOON, Mee Sup. **MTOR as a key regulator in maintaining skeletal muscle mass**. [S. l.]: Frontiers Media S.A., 2017.

YUAN, Lei *et al.*, Muscle-specific E3 ubiquitin ligases are involved in muscle atrophy of cancer cachexia: An in vitro and in vivo study. **Oncology Reports**, [s. l.], v. 33, n. 5, p. 2261–2268, 2015.

ZEVOLIS, Evangelos *et al.*, The Effects of Mechanical Loading Variations on the Hypertrophic, Anti-Apoptotic, and Anti-Inflammatory Responses of Differentiated Cardiomyocyte-like H9C2 Cells. **Cells**, [s. l.], v. 11, n. 3, p. 473, 2022.

11. Apêndice

Resumo apresentado e publicado em anais do congresso internacional “15th Cachexia Conference 2022” realizado em Portugal em Junho de 2022.

POSTER ABSTRACTS

myeloperoxidase: 30.0 ng/mL (23.0-36.0) vs. 18.0 ng/mL (12.6-29.7), $p=0.0822$ vs. 20.2 ng/mL (15.9-28.7), $p=0.0175$; elastase: 132.5 ng/mL (90.9-227.2) vs. 100.3 ng/mL (67.2-218.2) $p=0.8619$ vs. 94.9 ng/mL (73.1-109.6), $p=0.0097$; respectively). Similarly, CRP/albumin ratio (inflammation marker) was higher in cachectic patients with high lipocalin 2 levels (3.2, 1.4-6.7) as compared to non-cachectic patients (1.2, 0.6-1.7) or cachectic patients with low lipocalin 2 levels (2.3, 0.7-8.9). Although markers of neutrophil activation did not correlate with severity of cachexia, strong positive correlations between lipocalin 2 and calprotectin ($r_s=0.36$, $p=0.0009$), myeloperoxidase ($r_s=0.48$, $p<0.0001$), and elastase ($r_s=0.50$, $p<0.0001$) were observed.

Conclusions: These data suggest that elevated lipocalin 2 levels in pancreatic cancer cachexia are caused by neutrophil activation, and warrant investigations into the role of neutrophils in cachexia development.

4-27

Masseter thickness index as an anthropometric prognostic biomarker in head & neck cancer cachexia: A retrospective pilot study

Julían Balanta-Melo^{1,2}, Alexander J. Jones³, Michael G. Moore³, Andres Bonetto⁴

¹Department of Anatomy, Cell Biology & Physiology, Indiana University School of Medicine, Indianapolis, USA;

²Universidad del Valle School of Dentistry, Cali, Colombia;

³Department of Otolaryngology – Head & Neck Surgery, Indiana University School of Medicine, Indianapolis, USA;

⁴Department of Surgery, Simon Comprehensive Cancer Center; Indiana Center for Musculoskeletal Health, Indiana University School of Medicine, Indianapolis, USA

Introduction: Cancer cachexia (CA-CX) is characterized by progressive loss of skeletal muscle, with or without loss of fat, that cannot be reversed by nutritional support. Criteria for CA-CX include either one or a combination of: weight loss >5% (last six months; no starvation), Body Mass Index (BMI) <20 + weight loss >2% and Appendicular Skeletal Muscle index (ASMI) indicating sarcopenia + weight loss >2%. ASMI is generally obtained from computerized tomography (CT). Unfortunately, full body CT is rarely available in head & neck cancer (HNC) patients. Here we analyze the masseter muscle thickness as an alternative method to discriminate between patients with HNC-cachexia and non-cachexia (NCX).

Methods: HNC CT datasets (DICOM) from sex-, race-, height- and age-matched white males were retrospectively analyzed. For three-group comparison, patients fulfilling all three criteria for CA-CX (CA-CX; $n=8$) and patients with cancer but no CX (CA-NCX; $n=5$) were analyzed relative to no cancer, non-cachectic, healthy control patients (CTRL; $n=5$). For two-group comparison we included: CA-CX and NCX (CA-NCX + CTRL) groups. Left masseter muscle was segmented with a 3D-imaging software. 3D distribution of masseter thickness, body weight, BMI, and MTI (average masseter thickness/height²) were retrieved. Area Under the Curve (AUC) of the Receiver Operating Characteristics (ROC) analysis was calculated. All statistical analyses were blinded.

Results: CA-CX subjects exhibited reduced body weight and

4-29

Cardiomyoblasts mitochondrial activity is altered in an *in vitro* model of cardiac cachexia induced by Walker-256 tumour

Maiara C Colombara, Gabriela M Chiochetti, André G Oliveira, Maria Cristina C Gomes-Marcondes

Laboratory of Nutrition and Cancer, Department of Structural and Functional Biology; Institute of Biology, State University of Campinas (UNICAMP), Sao Paulo, Brazil

Introduction: Cancer cachexia is a multifactorial syndrome affecting many tissues and organs, including the heart, with an unfavourable diagnosis. The mechanism of these cardiac alterations is not yet fully known, and thus experimental assays are essential for a better understanding of these mechanisms. Since studies have shown mitochondrial activities altered in many diseases, being one important target to find new therapies strategies, in this study, we used an *in vitro* cardiac cachexia model induced by Walker-256 tumour to evaluate mitochondrial activity.

Methods: H9c2 cells were exposed to 5% ascitic fluid (A) or thermally inactivated (IA), obtained from cachectic Walker-256 tumour-bearing rats. Cell viability was analysed by the MTT assay, cellular respiration by the oxygen consumption rate (OCR), and reactive oxygen species (ROS) detection by the DHE assay.

Results: Ascitic fluid decreased cell viability (Fig 1A) and showed a trend decrease in all cellular respiration parameters compared to the control group (Fig 1B). However, inactivated ascitic fluid partially restored cell viability (Fig 1A) and recovered cellular respiration at basal and maximal levels (Fig 1 B), also improving reserve capacity and mitochondrial ATP production in relation to ascitic fluid (A). Ascitic fluid with and without inactivation did not alter ROS production (Fig 1C).

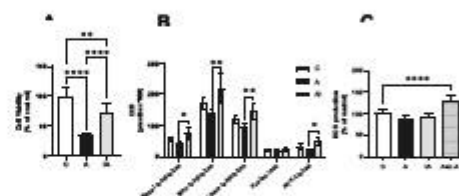


Figure 1. H9c2 cell viability assay (A), oxygen consumption rate (OCR) (B), and ROS production (C). Data are mean $\pm$ SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.0001$.

Conclusions: Ascitic fluid, simulating cardiac cachexia due to deleterious factors content, altered mitochondrial metabolism of cardiomyoblasts, but when the ascitic fluid was inactivated, there was a partial restoration to the normal pattern of myocardial cell activity in these cells. These changes may not be related to ROS production. More studies are undergoing to better understand the possible cellular mechanisms. Financial support: FAPESP (2017/02739-4; 2018/20581-1; 2019/14803-4; 2020/13222-5).

Link do repositório em que cada trabalho foi depositado: <chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://society-scw.org/wp-content/uploads/2022/11/Programme-Abstract-Book-2022.pdf>

12. Anexos

Anexo 1

Tabela Suplementar 1: Concentração média de metabólitos no líquido ascítico e líquido ascítico inativado (mM)

Metabólitos	Líq. ascítico	Líq. ascítico inativado
2'-Deoxyuridine	0,006900	0,006600
2-Aminobutyrate	0,003950	0,004100
2-Hydroxybutyrate	0,020850	0,020850
2-Hydroxyisovalerate	0,019950	0,019050
2-Oxoglutarate	0,007000	0,005950
2-Oxoisocaproate	0,006750	0,006300
3-Hydroxybutyrate	0,551750	0,515350
3-Hydroxyisobutyrate	0,024500	0,025500
3-Methyl-2-oxovalerate	0,007150	0,006700
4-Aminobutyrate	0,026350	0,026550
Acetate	0,087800	0,093950
Acetoacetate	0,006750	0,007150
Acetone	0,680450	0,677300
Alanine	0,388300	0,380650
Arginine	0,011550	0,016600
Asparagine	0,029350	0,027750
Aspartate	0,004150	0,002250
Betaine	0,036900	0,035150
Carnitine	0,009250	0,010100
Choline	0,014400	0,012350
Citrate	0,007550	0,005300**
Creatine	0,245050	0,239550
Creatine phosphate	0,006100	0,004750
Creatinine	0,010700	0,011900
Dimethylamine	0,000750	0,003050#
Ethanol	1,314500	1,319550
Formate	0,012200	0,013800
Glucose	0,022000	0,024400

Continuação Tabela Suplementar 1: Concentração média de metabólitos no líquido ascítico e líquido ascítico inativado (mM)

Metabólitos	Líqu. ascítico	Líqu. ascítico inativado
Glutamate	0,063050	0,066900
Glutamine	0,016450	0,018600
Glycerol	0,056650	0,056100
Glycine	0,216050	0,209600***
Histidine	0,026550	0,027850
Isoleucine	0,032050	0,038350
Lactate	2,778600	2,649750***
Leucine	0,051450	0,039550
Lysine	0,085950	0,087100
Methionine	0,023250	0,022850
N,N-Dimethylglycine	0,002100	0,001950
NNitrosodimethylamie	0,002950	0,002700
O-Acetylcarnitine	0,014300	0,014800
Ornithine	0,038200	0,031550
Pantothenate	0,003950	0,001900
Phenylalanine	0,035900	0,031400
Proline	0,101950	0,084850
Pyruvate	0,037850	0,044150**
Sarcosine	0,001450	0,001250
Serine	0,016000	0,018500
Succinate	0,017100	0,017200
Taurine	0,147850	0,136400
Threonine	0,033950	0,031150
Tryptophan	0,007000	0,007850
Tyrosine	0,048750	0,045700
Uracil	0,008650	0,008550
Urea	0,744000	0,852650
Valine	0,090750	0,090200
myo-Inositol	0,104700	0,102850
sn-Glycero-3-phosphocholine	0,006100	0,004850
π -Methylhistidine	0,008450	0,008350



COORDENADORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
Universidade Estadual de Campinas
Caixa Postal 6109, 13083-970, Campinas, SP, Brasil
Fone (19) 3521-6378. email: cpgib@unicamp.br



DECLARAÇÃO

Em observância ao §5º do Artigo 1º da Informação CCPG-UNICAMP/001/15, referente a Bioética e Biossegurança, declaro que o conteúdo de minha Dissertação de Mestrado, intitulada *"Avaliação da suplementação com leucina sobre os efeitos de fatores tumorais em células musculares cardíacas H9c2"*, desenvolvida no Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular e Morfofuncional do Instituto de Biologia da Unicamp, não versa sobre pesquisa envolvendo seres humanos, animais ou temas afetos a Biossegurança.

Assinatura: Maiara C. Colombero
Nome do(a) aluno(a): Maiara Caroline Colombero

Assinatura: Maria Cristina Cintra Gomes Maranhães
Nome do(a) orientador(a): Maria Cristina Cintra Gomes Maranhães

Data: 30/07/2024

Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **Avaliação da suplementação com leucina sobre os efeitos de fatores tumorais em células musculares cardíacas H9c2**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 30 de Julho de 2024

Assinatura : Maiara C. Colombero
Nome do(a) autor(a): **Maiara Caroline Colombero**
RG n.º 41217413-3

Assinatura : Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes
Nome do(a) orientador(a): **Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes**
RG n.º 10153517