



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

MARIA ISABEL FAUSTINONI BRUNO

**QUALIDADE DA PERDA DE MASSA MUSCULAR E DE
PARÂMETROS FUNCIONAIS NOS ESTÁGIOS PRECOCE E
AVANÇADO DA CAQUEXIA INDUZIDA POR CARCINOMA
COLORRETAL C26, EM CAMUNDONGOS BALB/C**

MARIA ISABEL FAUSTINONI BRUNO

**QUALIDADE DA PERDA DE MASSA MUSCULAR E DE
PARÂMETROS FUNCIONAIS NOS ESTÁGIOS PRECOCE E
AVANÇADO DA CAQUEXIA INDUZIDA POR CARCINOMA
COLORRETAL C26, EM CAMUNDONGOS BALB/C**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina como requisito para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Flávia Alessandra Guarnier

Londrina
2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

B898q Bruno, Maria Isabel Faustiloni.
Qualidade da perda de massa muscular e de parâmetros funcionais nos estágios precoce e avançado da caquexia induzida por carcinoma colorretal C26, em camundongos Balb / Maria Isabel Faustiloni Bruno. - Londrina, 2021. 79 f. : il.

Orientador: Flávia Alessandra Guarnier.
Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2021.
Inclui bibliografia.

1. Câncer - Tese. 2. Massa muscular - Tese. 3. Estresse oxidativo - Tese. 4. Função física - Tese. I. Guarnier, Flávia Alessandra . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. III. Título.

CDU 616

MARIA ISABEL FAUSTINONI BRUNO

**QUALIDADE DA PERDA DE MASSA MUSCULAR E DE
PARÂMETROS FUNCIONAIS NOS ESTÁGIOS PRECOCE E
AVANÇADO DA CAQUEXIA INDUZIDA POR CARCINOMA
COLORRETAL C26, EM CAMUNDONGOS BALB/C**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina como requisito para a obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof. Dra. Flávia Alessandra
Guarnier
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Dawit Albieiro Pinheiro Gonçalves
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Prof. Dr. Eduardo José de Almeida Araújo
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 30 de julho de 2021.

Dedico este trabalho aos meus pais, aos meus irmãos, e aos meus avós Paulo e Ercília. Obrigada pelo companheirismo e por nunca desistirem de mim. À vocês, minha eterna gratidão

Agradecimentos

Primeiramente, agradecer à Deus pelo dom da vida, por me guiar e dar luz mesmo nas horas mais difíceis, nessa caminhada e na vida.

Agradeço ao meu pai, José Carlos Bruno, por ser meu pai, meu melhor amigo, meu companheiro, meu confidente, o colo para onde eu sempre corro quando as coisas apertam; por sempre me apoiar, por estar presente em todos os momentos, mesmo de longe; obrigada por ser esse pai e amigo maravilhoso que você é. À minha mãe, minha primeira professora, que me ensinou a ler e escrever; obrigada por tudo, hoje e sempre.

Aos meus irmãos, Ana Flávia, Maria Helena e Paulo Vitor; o simples fato de existirem, já é o suficiente.

Aos meus avós, Paulo Bruno e Ercília Pereira Bruno que mesmo não estando mais aqui, me guiam lá de cima. Sinto falta de vocês. Muita. Todos os dias.

À minha amiga-irmã, Lauane Ferreira Martins, obrigada por me permitir fazer parte da sua vida, e estar comigo em todos os momentos dessa jornada e da minha vida; ainda teremos muitos momentos a compartilhar. Obrigada.

Aos meus amigos da vida, Leonardo de Lima, Nara Campese, Giovanna Espósito, Gabriela Aguiar, Jéssica Orsini, Juliana Sene, Alayane Fukuoka e Karoline Takahashi. Obrigada por compartilharem a vida comigo, e por me mostrarem todos os dias o significado e valor da palavra Amizade.

Aos meus amigos Fabrício Inoue, Liara Freitas, Raquel Nakama, Lucas Felipe, Rafaela Curti e Isabela Chagas; a amizade e companhia de vocês tornou tudo mais fácil e leve, ajudou na superação dos momentos mais difíceis, e se tornaram a minha família londrinense. Obrigada, amigos!

À minha mais nova família universitária, Gabriela Fernandes, Letícia Vieira, Carolina Simões e Marcia Nataly. Agradeço por me receberem de braços abertos na nova casa.

Aos técnicos de laboratório, Zui e Pedro. Obrigada pelas pesagens, pela ajuda nas eutanásias, pelas confecções de lâminas, mas, acima de tudo, pela amizade e carinho. Vocês se tornaram grandes amigos.

Às colegas e amigas de laboratório, Fernanda Paschoal e Heloíza Bordini. Meninas, obrigada por me ensinarem tudo do zero, por pegarem na minha mão, pela

ajuda nos experimentos, pelo auxílio na escrita e correção deste trabalho. Sem vocês, isso não seria possível. À Hannah Hamada, que veio a se tornar uma grande amiga e companheira, obrigada por sempre me socorrer nos experimentos *in vitro*. À Erika Yumi, vivemos muitas coisas e perrengues no laboratório. Obrigada por ser minha companheira e amiga naquela UEL, de segunda a segunda.

Agradeço à Casimiro Miguel pela companhia nas madrugadas e me alegrar quando eu já não aguentava mais, muito obrigada pelas lives.

Aos meus dois grandes ídolos do esporte Ayrton Senna e Lewis Hamilton, por me inspirarem todos os dias a ser uma boa profissional, e além de tudo, uma pessoa melhor. Vocês tem minha total admiração e respeito, são ídolos eternos.

À minha orientadora, Prof.^a Dra. Flávia Alessandra Guarnier. Prof.^a, se você soubesse a gratidão que eu sinto por você, por tudo que fez, faz e ainda fará por mim. Nada no mundo seria capaz de descrever. Obrigada por me aceitar em seu laboratório, me receber, me orientar, acreditar em mim, não desistir de mim quando eu já não tinha mais forças para superar os obstáculos, segurar a barra comigo quando o mundo estava desabando, por me pedir coisas “mirabolantes” que eu nem sabia do que se tratava, e muito menos sabia que conseguiria fazer. Obrigada pelas conversas e conselhos, e por me ajudar a controlar a ansiedade e organizar melhor meus pensamentos. E não menos importante, agradeço pelas broncas e puxões de orelhas, que moldaram o que eu sou hoje. Obrigada por sua pesquisa imaginativa e colaboradora, por sua dedicação à educação, por nos mostrar o entusiasmo e alegria pela pesquisa mesmo nos momentos difíceis, e por servir como modelo de papel inspirador. Obrigada por ser essa excelente orientadora e amiga; é uma honra ser orientada por uma pessoa tão brilhante e cheia de luz como você. Prof.^a, Obrigada!

Agradeço à CAPES, pelo auxílio financeiro.

“Reze e trabalhe, fazendo de conta que esta vida é um dia de capina com sol quente, que às vezes custa muito a passar, mas que sempre passa. E você ainda pode ter um muito pedaço bom de alegria (...) Cada um tem a sua hora e a sua vez: você há de ter a sua.”

Guimarães Rosa, Sagarana

Bruno, Maria Isabel Faustiloni. **Qualidade da perda de massa muscular e de parâmetros funcionais nos estágios precoce e avançado da caquexia induzida por carcinoma colorretal C26, em camundongos Balb/c.** 2021. 75 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

RESUMO

A Caquexia é uma síndrome multifatorial e complexa, presente em doenças inflamatórias crônicas, como diabetes, Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica e câncer. É frequentemente associada ao declínio da função física e qualidade de vida, baixa tolerância às terapias, e à diminuição da sobrevida. No câncer, é a causa direta da mortalidade em até 40% dos pacientes. Diversos fenômenos estão envolvidos na fisiopatologia da caquexia, dentre eles fenômenos metabólicos, inflamatórios e oxidativos. Sabe-se que a produção de citocinas pró-inflamatórias está relacionada com diminuição da ingestão alimentar, bem como com a formação de espécies reativas de oxigênio que regulam positivamente vias de degradação proteica e atrofia muscular. O objetivo deste estudo foi diferenciar os efeitos da caquexia em diferentes tipos de fibras musculares esqueléticas, em tempos experimentais distintos, bem como o envolvimento de alterações bioquímicas, oxidativas e funcionais em um modelo experimental de carcinoma colorretal - C26 em camundongos. Foram coletados os músculos sóleo, extensor longo dos dedos, gastrocnêmio e tibial anterior para análise da perda de massa muscular. Modificações oxidativas e lipídeos foram avaliadas por meio da quantificação de malondialdeído por TBARS e quimiluminescência estimulada por butil hidroperóxido, a oxidação de proteínas por ELISA, e *western blotting* foi a técnica escolhida para quantificação da proteína Retículo Sarcoplasmático Cálcio ATPase. Nossos resultados apontam para perda de massa muscular oxidativa no estágio de caquexia, que foram coincidentes com os achados da carbonilação de proteínas, enquanto a análise de fibras mistas demonstrou lesão oxidativa de membranas nos estágios inicial e tardio da síndrome. A avaliação de parâmetros funcionais de mobilidade e capacidade física mostrou que o comprometimento funcional atinge diferentes habilidades durante os estágios de desenvolvimento da caquexia, apontando para correlação nos distúrbios do cálcio. Este trabalho sugere que, neste modelo experimental, diferentes tipos de fibras musculares respondem de maneiras diferentes, e que o comprometimento funcional também varia temporalmente, abrindo possibilidades para tratamento específico durante os diferentes estágios da síndrome.

Palavras-chave: câncer; massa muscular; estresse oxidativo; função física

Bruno, Maria Isabel Faustinoni. **Quality of muscle mass loss and functional parameters at early and advanced stages of colorectal cancer-induced cachexia in Balb/c mice. 2021.** 77 p. Dissertation (Master's in Experimental Pathology) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

ABSTRACT

Cachexia is a multifactorial and complex syndrome present in chronic inflammatory diseases such as diabetes, Chronic Obstructive Pulmonary Disease and cancer. It is often associated with declining in physical function and quality of life, poor tolerance to therapies, and decreased survival. In cancer, it is the direct cause of mortality in up to 40% of patients. Several phenomena are involved in the pathophysiology of cachexia, including metabolic, inflammatory, and oxidative stress. It is known that the production of pro-inflammatory cytokines is related to decreased food intake, as well as the formation of reactive oxygen species that positively regulate protein degradation pathways and muscle atrophy. The aim of this study was to differentiate the effects of cachexia in different types of skeletal muscle fibers, at different experimental times, as well as the involvement of biochemical, oxidative, and functional alterations in an experimental model of colorectal carcinoma - C26 in mice. The soleus, extensor digitorum longus, gastrocnemius and tibialis anterior muscles were collected to analyze the loss of muscle mass. Oxidative to lipid were evaluated through the quantification of Malondialdehyde by TBARS and chemiluminescence stimulated by butyl hydroperoxide, protein oxidation by ELISA, and western blotting was the chosen technique for quantification of the Sarcoplasmic Reticulum Calcium ATPase protein. Our results point to loss of oxidative muscle mass in the cachexia stage, which coincided with the findings of protein carbonylation, while the mixed fiber analysis showed oxidative damage to membranes in the early and late stages of the syndrome. The evaluation of functional parameters of mobility and physical capacity showed that functional impairment affects different abilities at different stages of cachexia development, pointing to a correlation in calcium disorders. This work suggests that, in this experimental model, different types of muscle fibers respond in different ways, and that functional impairment also varies over time, opening possibilities for treating the syndrome.

Key words: cancer; muscle mass; oxidative stress; physical function

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|---|----|
| Figura 1 – Estágios da Caquexia | 15 |
| Figura 2 – Ativação das vias proteolíticas das calpaínas, caspase-3 e o sistema proteassoma no músculo esquelético por espécies reativas de oxigênio | 23 |
| Figura 3 – Organização do Músculo Estriado Esquelético | 25 |
| Figura 4 – Acoplamento Excitação – Contração | 29 |
| Figura 5 – Acoplamento Excitação – Contração em condições normais e patológicas | 74 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|-------------------|--|----|
| Tabela 1 - | Diferenças entre anorexia e caquexia | 19 |
|-------------------|--|----|

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

| | |
|--------------|--|
| ATGL | Lipase triglicerídeo adiposa |
| ATP | Adenosina trifosfato |
| ATPase | Adenosinatrifosfatases |
| BSA | Albumina sérica bovina |
| CCR | Carcinoma Colorretal |
| CRUs | Unidades liberadoras de cálcio |
| DHPRs | Receptores diidropiridina |
| DPOC | Doença Pulmonar Obstrutiva Crnica |
| E1 | Enzimas ativadoras de ubiquitina |
| E2 | Enzimas conjugadoras de ubiquitina |
| E3 | Ubiquitina ligases |
| EC | Acoplamento excitação-contração |
| EDL | Extensor longo dos dedos |
| ELISA | Ensaio de imunoabsorção enzimática |
| ERN | Espécies reativas de nitrogênio |
| ERO | Espécies reativas de oxigênio |
| GAST | Gastrocnmio |
| HGT | <i>Hand Grip Test</i> |
| HSL | Lipase sensível ao hormônio |
| IL-1 β | Interleucina-1beta |
| IL- 6 | Interleucina-6 |
| IMC | ndice de Massa corporal |
| LMF | Fator mobilizador de lipídeos |
| MDA | Malondialdeído |
| NFkB | Fator nuclear kappa <i>b</i> |
| NPY | Neuropeptídeo Y |
| EO | Estresse oxidativo |
| PBS | Solução salina tamponada |
| PIF | Fator indutor de proteólise |
| RYR1 | Canal de liberação de cálcio Ryanodina 1 |
| SERCA | ATPases sarco/retículo endoplasmático |
| SNC | Sistema nervoso central |

| | |
|----------------|--------------------------------|
| SOL | Sóleo |
| RS | Retículo sarcoplasmático |
| TA | Tibial Anterior |
| TBARs | Ácido Tiobarbitúrico |
| TNF – α | Fator de Necrose Tumoral alfa |
| TT | Túbulo transverso |
| UPS | Sistema ubiquitina-proteassoma |
| WAT | (tecido adiposo branco) |

SUMÁRIO

| | | |
|----------|---|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 13 |
| 1.1 | CARCINOMA COLORRETAL | 13 |
| 1.2 | CAQUEXIA | 14 |
| 1.3 | ALTERAÇÕES METABÓLICAS NA CAQUEXIA..... | 16 |
| 1.4 | CAQUEXIA E ESTRESSE OXIDATIVO..... | 18 |
| 1.5 | DEGRADAÇÃO DE PROTEÍNAS..... | 21 |
| 1.6 | ESTRUTURA DO MÚSCULO ESQUELÉTICO | 23 |
| 1.6.1 | Fibras de Contração Lenta (TIPO I)..... | 26 |
| 1.6.2 | Fibras de Contração Rápida (Tipo II)..... | 26 |
| 1.6.3 | Contração Muscular..... | 27 |
| 2 | JUSTIFICATIVA | 31 |
| 3 | OBJETIVOS | 32 |
| 3.1 | OBJETIVO GERAL..... | 32 |
| 3.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 32 |
| | ANEXO 1 | 39 |
| | ANEXO 2 | 77 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 CARCINOMA COLORRETAL

O câncer é a segunda causa de morbi-mortalidade no mundo, representando aproximadamente 18 milhões de novos casos e 9,6 milhões de mortes ao ano (Instituto Nacional de Câncer [INCA] 2020). Dentre os tipos de câncer, o câncer colorretal (CCR) é um dos mais comuns, sendo o terceiro mais comumente diagnosticado na população humana (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2021). Mundialmente, cerca de 3,5 milhões de pessoas são acometidas por CCR e estima-se 1,3 milhão de novos diagnósticos e 700 mil mortes, anualmente (ARGILÈS et al., 2010). Nos Estados Unidos, o CCR é a terceira causa principal de mortes relacionadas ao câncer em homens e mulheres, e o segundo câncer que mais causa vítimas quando o número de vítimas de ambos os sexos é somado (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2021). Para o triênio 2020-2022, estima-se que o Brasil registre 41.010 novos casos de câncer colorretal (ONCOGUIA, 2021), e segundo o INCA, a estimativa de novos casos foi de 40.990 (INCA, 2021). O CCR abrange os tumores que se iniciam no cólon, reto e ânus (INCA, 2021). Fatores ambientais e genéticos têm influência importante na patogênese do câncer de cólon, além da condição socioeconômica. Pessoas com baixa condição socioeconômica apresentam risco aumentado de desenvolvimento de câncer colorretal, o que seria explicado pela dificuldade de acesso aos recursos de saúde (BRENNER et al., 2014).

São vários os fatores de risco envolvidos no CCR: idade, sexo, história familiar (síndrome de Lynch e polipose), doença inflamatória intestinal, tabagismo, consumo excessivo de álcool, diabetes mellitus, e alto consumo de carnes vermelhas e alimentos processados (BRENNER et al., 2014; THANIKACHALAM & KHAN, 2019). SHIVAPPA et al. (2017) demonstraram, por intermédio de uma meta-análise, risco aumentado na incidência de CCR para indivíduos que apresentam consumo maior de alimentos com alto Índice Inflamatório, como carnes vermelhas. Limitar o consumo de alimentos pró-inflamatórios e aumentar o consumo de componentes anti-inflamatórios, como frutas e vegetais, poderia desempenhar um papel importante na prevenção do CCR.

Em humanos, o índice de massa corporal (IMC) tem sido associado ao risco de desenvolver CCR, assim como com a sobrevida e sobrevivência após o seu diagnóstico (BUSQUETS *et al.*, 2013). A caquexia, uma síndrome associada à

1 perda de peso, é uma consequência comum no CCR, e estudos longitudinais que
2 avaliem mudança de peso ao longo do tempo podem fornecer um quadro mais
3 completo de como o peso corporal está associado à sobrevivência ao câncer.

4 Os estudos em humanos se tornam um problema a partir do
5 momento em que a perda de peso e outros sintomas relacionados à síndrome da
6 caquexia são pobremente avaliados ou diagnosticados. Poucos estudos avaliam a
7 mudança de peso em adultos no que se refere à sobrevivência do CCR, mas sugerem
8 que a perda de peso pós-diagnóstico pode estar associada à menor sobrevivência
9 (TISDALE, 2008). Pacientes com caquexia por câncer têm função física deficiente e
10 apresentam alto risco de incapacidades, hospitalizações prolongadas e morte intra-
11 hospitalar (LeBLANC et al., 2014).

12 O carcinoma de cólon C26 murino é um modelo experimental
13 bastante utilizado no estudo da caquexia (BALLARÓ *et al.*, 2016). Sua maior
14 vantagem reside no fato de vários estudos sobre perda de massa muscular terem sido
15 desenvolvidos no modelo, proporcionando uma gama de comparações e conclusões
16 possíveis. Estudos demonstram que, neste modelo, a acelerada atrofia muscular se
17 deve ao aumento no catabolismo de proteínas associado ao hipoanabolismo,
18 resultando em uma redução líquida na massa muscular total (BARACOS, 2001).

19

20 1.2 CAQUEXIA

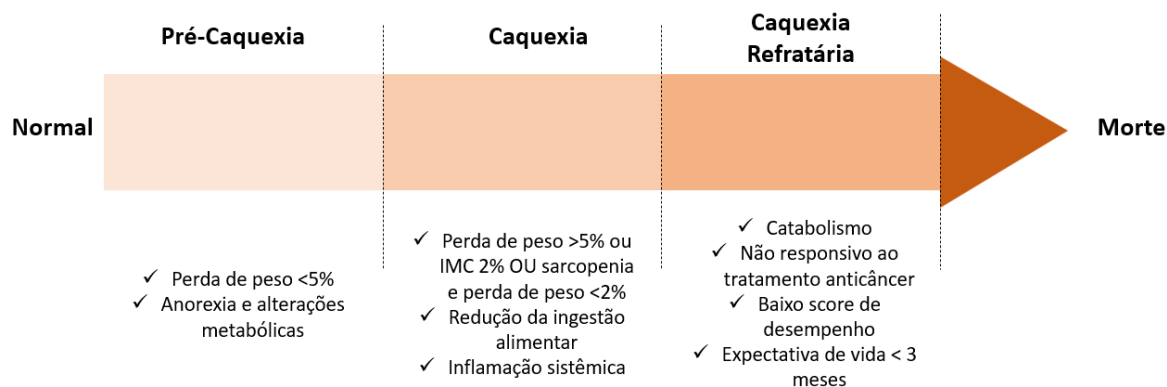
21 A caquexia é uma síndrome multifatorial complexa caracterizada pela
22 perda contínua de peso corporal, que não pode ser totalmente revertida pelo suporte
23 nutricional convencional e leva ao comprometimento funcional progressivo (FEARON
24 et al., 2011). A palavra caquexia vem do grego, “kakos” - “mau” e “hexis” - “estado”.
25 Essa síndrome é associada à perda de massa muscular, à reduzida ingestão de
26 alimentos e, principalmente, à acelerada degradação de proteínas (TISDALE., 2002).
27 A caquexia pode ser reconhecida como efeito adverso do câncer e é frequentemente
28 associada à redução da função física, diminuição da qualidade de vida, baixa
29 tolerância às terapias anticâncer e à reduzida sobrevida. Pode estar presente em
30 doenças inflamatórias crônicas, tais como insuficiência cardíaca, insuficiência renal,
31 doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
32 (AIDS) e câncer.

33 No câncer, a caquexia constitui causa direta da mortalidade em até
34 40% dos pacientes, porém pouco aparece nos painéis estatísticos como causa de

1 morte. É raramente identificada ou diagnosticada e, ainda com menor frequência,
 2 tratada. Apenas 2,4% dos pacientes diagnosticados com câncer recebem o
 3 diagnóstico de caquexia. Deste percentual, somente 6,4% recebem tratamento.
 4 (CONSENSO BRASILEIRO DE CAQUEXIA, 2011).

5 A partir de 2011, quando foi definida em Consenso, a caquexia passou
 6 a ser dividida em três estágios:

- 7 (I) pré-caquexia, caracterizada por sinais clínicos e metabólicos iniciais
 8 (anorexia e tolerância à glicose diminuída), podendo preceder perda de
 9 peso involuntária $\leq 5\%$;
- 10 (II) caquexia, caracterizada por perda de massa corporal superior a 5%, **ou**
 11 índice de massa corporal (IMC) $< 20 \text{ kg/m}^2$ associado à perda de massa
 12 contínua $> 2\%$, **ou** também sarcopenia acompanhada da perda de
 13 massa $< 2\%$; e
- 14 (III) caquexia refratária, caracterizada por um estágio avançado da síndrome,
 15 com atividade altamente catabólica e não-responsividade ao tratamento
 16 anticâncer (Figura 1) (FEARON et al., 2011).



19 **Figura 1:** Classificação dos Estágios de Caquexia. Adaptado de Fearon et al., 2011.

20
 21 A patogênese da caquexia no câncer é um fenômeno complexo e
 22 inclui alterações nutricionais, resposta hipercatabólica global, inflamação crônica e
 23 metabolismo energético alterado (ARGILÉS et al., 2015). Como visto, a sarcopenia é
 24 considerada uma característica importante para classificação da síndrome. Uma parte
 25 destas conclusões foram obtidas a partir de dados pré-clínicos.

26 Como já apresentado, dentre os modelos experimentais bem
 27 estabelecidos utilizados no estudo da caquexia, encontra-se o carcinoma colorretal
 28 C26 (BALLARÒ et al., 2016). O modelo C26 apresenta alta atividade tumorigênica e

1 baixa tendência à metastatização (AULINO et al., 2010). Ainda, vários estudos sobre
2 perda de massa muscular foram desenvolvidos neste modelo, proporcionando uma
3 gama de comparações e conclusões possíveis.

4 5 1.3 ALTERAÇÕES METABÓLICAS NA CAQUEXIA 6

7 No câncer existem anormalidades no metabolismo de lipídios,
8 carboidratos e proteínas, o que posteriormente leva à desregulação do metabolismo
9 energético, e, conseqüentemente, a um gasto energético elevado. Este gasto
10 energético elevado em repouso promove balanço energético negativo, e que estaria
11 relacionado, em parte, ao metabolismo do próprio tumor. Os tumores competem com
12 outros órgãos e tecidos por combustíveis energéticos e substratos biossintéticos, e
13 possuem uma taxa metabólica intrínseca, a qual está relacionada à sua massa e grau
14 de metabolismo energético aeróbio *versus* anaeróbio (BARACOS et al., 2018;
15 PORPORATO et al., 2016). Parte do desequilíbrio energético, em alguns pacientes,
16 se deve à anorexia associada ao quadro de caquexia.

17 A anorexia é definida como perda de apetite provocada por alterações
18 centrais e periféricas, mas também pelo tratamento quimioterápico, que provoca
19 alterações no paladar, e leva à aversão por comida, agravando o quadro de anorexia
20 na síndrome (VAUGHAN *et al.*, 2013). Na anorexia, não há perda de massa muscular
21 esquelética e o suplemento nutricional pode repor a massa corporal, ao contrário do
22 que acontece na caquexia; além disso, somente a anorexia não seria capaz de causar
23 todas as anormalidades metabólicas encontradas na caquexia (Tabela 1). A anorexia
24 pode ser dividida em duas categorias: (I) anorexia primária, que acontece por uma
25 percepção alterada da imagem corporal levando à recusa voluntária de se alimentar;
26 e (II) anorexia secundária, que acontece como conseqüência de uma resposta
27 inflamatória elevada ou secundária a doenças crônicas ou agudas. Em pacientes com
28 câncer, a caquexia independente da anorexia está presente e é associada ao aumento
29 da morbi-mortalidade e redução da qualidade de vida. Pacientes com câncer, com
30 evidências de inflamação sistêmica, possuem ingestão alimentar reduzida, sugerindo
31 um possível papel das citocinas pró-inflamatórias na supressão do apetite (FEARON
32 et al., 2012; SILVA et al., 2020; STEWART et al., 2006).

33 A resposta pró-inflamatória pode ser a responsável pela ativação das
34 vias cerebrais anorexigênicas (supressoras de apetite) e inibição das orexigênicas

1 (estimulantes de apetite) que levam à diminuição da produção do neuropeptídeo Y
2 (NPY) e, acompanhada de diminuição da ingestão alimentar. Em pacientes com
3 câncer, as áreas do cérebro que controlam a homeostase energética sofrem
4 alterações funcionais que contribuem para o início e progressão da anorexia, aumento
5 do catabolismo nos músculos e tecido adiposo. A inflamação hipotalâmica pode atuar
6 como receptor e amplificador da inflamação sistêmica, aumentando a disponibilidade
7 de serotonina no hipotálamo, o que pode levar a mudanças na ingestão alimentar, e
8 consequente diminuição do apetite (ARGILÉS et al., 2014; SILVA et al., 2020).

9 A interleucina-1 β (IL-1 β) tem sido associada à indução de anorexia,
10 bloqueando a alimentação induzida pelo NPY. Os níveis desta molécula são reduzidos
11 em ratos com tumores, demonstrando uma correlação entre a ingestão de alimentos
12 e a IL-1 β (FEARON et al., 2002; INUI et al., 2002). Além disso, IL-1 β e o fator de
13 necrose tumoral-alfa (TNF- α) também estão envolvidos na caquexia relacionada ao
14 câncer, aumentando os níveis do hormônio liberador de corticotropina (CRH), um
15 neurotransmissor do sistema nervoso central, que suprime a ingestão de alimentos
16 (VANDERVEEN et al., 2017). A Interleucina-6 (IL-6) é uma citocina envolvida em
17 defesas do hospedeiro e processos patológicos. A administração de IL-6 a
18 camundongos induz a perda de massa muscular e adiposa. A IL-6 sérica parece ser
19 um preditor sensível de perda de peso, incluindo pacientes com câncer avançado de
20 pulmão e câncer de cólon (ARGILÉS et al., 2003; VANDERVENN et al., 2017).

21 Sabe-se que os pacientes com caquexia associada ao câncer
22 apresentam uma redução da capacidade física. Os mecanismos da fadiga relacionada
23 ao câncer não são claros; fatores que estão envolvidos incluem a anemia, os
24 tratamentos para o câncer, massa tumoral e liberação de citocinas (STEWART et al.,
25 2006). Os eventos inflamatórios, como a liberação de citocinas (IL-6, TNF- α e IL- 1 β)
26 juntamente com os chamados fator de mobilização de lipídios (LMF) e fator de indução
27 de proteólise (PIF) (TISDALE, 2002) pelas células tumorais, culminam em
28 anormalidades metabólicas, como, por exemplo, a elevação do gasto energético em
29 repouso, em média de 100-200 kcal por dia, associada à redução do consumo de
30 alimentos. Isso compromete as vias de sinalização envolvidas na homeostase celular,
31 acarretando aumento na degradação proteica e diminuição da síntese de proteínas, o
32 que acaba por tornar a fadiga e fraqueza muscular um problema clínico grave
33 (POWERS et al., 2016).

1 Na caquexia, outro evento crítico parece ser a perda de tecido adiposo
2 branco. Três tipos diferentes de tecido adiposo (branco, bege e marrom) foram
3 caracterizados em relação ao seu papel no desenvolvimento de caquexia. O tecido
4 adiposo branco (*White Adipose Tissue* - WAT) armazena energia como triglicerídeos,
5 enquanto o tecido adiposo marrom, gasta energia com intuito de gerar calor. O tecido
6 adiposo bege é derivado do "escurecimento" do WAT, e parece ser um evento
7 sistêmico precoce durante o desenvolvimento da caquexia. O aumento da lipólise, o
8 gasto energético total elevado e os marcadores regulados positivamente da
9 termogênese do tecido adiposo marrom parecem ocorrer nas fases iniciais da
10 caquexia (GIRALT & VILLARROYA, 2013). DAS et al. (2011) demonstraram que a
11 inibição da lipólise através de deleção genética da lipase triglicerídeo adiposa (ATGL)
12 ou da lipase sensível ao hormônio (HSL), melhora certas características da caquexia
13 associada ao câncer. Camundongos *ATGL*^{-/-} com tumores resistiram ao aumento da
14 lipólise no WAT, apresentaram diminuição de núcleos de miócitos e degradação
15 muscular, mas mantiveram a massa muscular adiposa e músculo gastrocnêmio
16 normais. Camundongos *HSL*^{-/-} com tumores também foram protegidos, embora em
17 menor grau. Assim, a lipólise funcional é essencial na patogênese da caquexia
18 associada ao câncer, provavelmente na manutenção da energia necessária para
19 desempenho de capacidades vitais.

20 Além do exposto, o envolvimento do estresse oxidativo nos
21 mecanismos de ativação dos diversos sistemas de degradação de proteínas durante
22 a atrofia muscular no câncer tem sido fortemente provado e reforçado nos últimos
23 anos (GUARNIER et al., 2010).

24

25

26 1.4 CAQUEXIA E ESTRESSE OXIDATIVO

27

28 Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio (ERO e ERN,
29 respectivamente) são moléculas com capacidade oxidante e alta reatividade
30 (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2010). A geração endógena de ERO é proveniente,
31 principalmente, do metabolismo mitocondrial e de processos inflamatórios (HOHN et
32 al., 2013). Fontes exógenas da formação de ERO e ERN são representadas pelo
33 tabagismo, poluição, exercício físico intenso, consumo excessivo de álcool,
34 agrotóxicos, dentre outros (BARBOSA et al., 2010).

| Condição | Diferenças |
|-----------------|---|
| Caquexia | <ul style="list-style-type: none"> - Perda de peso (com ou sem perda de massa adiposa) - Perda ou não de apetite - Inflamação - Balanço energético e proteico negativo - Perda de massa muscular esquelética - Lipólise e escurecimento do tecido adiposo - Regeneração prejudicada de células musculares <ul style="list-style-type: none"> - Disfunção mitocondrial - Perturbação das vias neuronais - Resposta de fase aguda - Má absorção de nutrientes |
| Anorexia | <ul style="list-style-type: none"> - Perda de peso e massa adiposa, que pode ser revertida com suporte nutricional - Resposta inflamatória superior e/ou persistente - Perturbação das vias neuronais que regulam o comportamento alimentar |

1

2 **Tabela 1:** Diferenças entre anorexia e caquexia. Adaptado de Silva et al., 2020.

3

4 A geração de ERO e ERN é um processo contínuo e fisiológico, e possui papel
5 em diversas funções biológicas, como a geração de ATP, por meio da cadeia
6 transportadora de elétrons e participação de mecanismos de defesa durante o
7 processo de infecção (POWERS *et al.*, 2010; BARBOSA *et al.*, 2010).

8 A cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria é a principal fonte geradora
9 de radicais livres. Aproximadamente 85% do oxigênio respirado é utilizado pela
10 mitocôndria na cadeia respiratória, os 15% que restam são utilizados por enzimas
11 oxidases e oxigenases, e nas reações químicas de oxidação direta (BARBOSA *et al.*,
12 2010; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2010). Durante a cadeia transportadora de
13 elétrons, NADH é oxidado a NAD⁺ por um multicomplexo enzimático conhecido como
14 NADH-coenzima Q redutase, o complexo I, e os dois elétrons retirados são passados
15 à Coenzima Q10 (CoQ - ubiquinona). O complexo II é quem transfere elétrons a partir
16 do succinato para a CoQ10. A partir do Q, os elétrons passam por outro complexo
17 multiprotéico, o complexo III (contêm proteínas ferro-enxofre, citocromos b e c₁) e pelo
18 citocromo c. O citocromo c reduzido é reoxidado por outro complexo multiproteico, o
19 citocromo c oxidase (complexo IV), que contêm citocromo a, citocromo a₃, e cobre.
20 Para cada quatro elétrons retirados deste complexo, uma molécula de oxigênio é

1 completamente reduzida à duas moléculas de água (de 95 a 98% dos 85% utilizado
2 pela mitocôndria). Os 2 a 5% restantes são reduzidos em metabólitos classificados
3 entre as espécies reativas de oxigênio (BARBOSA et al., 2010; GUARNIER, 2010;
4 HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2010; SCHNEIDER & OLIVEIRA, 2004).

5 As ERO são contrabalanceadas pelas defesas antioxidantes, que têm
6 o objetivo de limitar os níveis intracelulares de tais espécies reativas e controlar a
7 ocorrência de danos causadas por elas. Esse sistema é constituído por substâncias
8 antioxidantes, que podem ter origem enzimática (superóxido dismutase, catalase e
9 glutathione peroxidase) ou não enzimática que são endógenas (zinco, manganês) ou
10 oriundas da dieta, como vitamina A, C e E (BARBOSA et al., 2010).

11 Quando o balanço entre a produção de ERO e ERN e a defesa
12 antioxidante é quebrado, ocorre o estabelecimento do denominado estresse oxidativo
13 (EO). Este processo leva à oxidação de biomoléculas (carboidratos, lipídios e
14 proteínas) (BARBOSA *et al.*, 2010). As proteínas são moléculas altamente
15 susceptíveis ao estresse oxidativo, e isso ocorre por serem abundantes nos tecidos.
16 Cerca de 50% de todas as proteínas corporais são encontradas no músculo estriado
17 esquelético (COSTELLI & BACCINO et al., 2003).

18 Quando saudável, o organismo é perfeitamente capaz de responder com um
19 eficiente sistema de defesa antioxidante, controlando a formação de ERO e ERN e
20 limitando seus efeitos prejudiciais (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2000). No entanto,
21 essas defesas podem não prevenir completamente o dano oxidativo (BLOKHINA et
22 al., 2003), resultando em adaptação ou lesão celular, podendo ser reversíveis ou não.
23 O alvo primário de lesão será definido pelo tipo celular e pela natureza do estresse
24 (DALLE-DONNE et al., 2001). Assim, o EO em pacientes caquéticos pode resultar de
25 vários mecanismos, entre eles a ingestão reduzida de alimentos devido a sintomas
26 como anorexia, náusea e vômito, com suprimento inadequado de nutrientes, ou, o que
27 parece ser mais aceito pela literatura, alterações metabólicas e inflamação crônica.
28 Em situações de doenças inflamatórias crônicas, as células imunes como, os
29 mastócitos e leucócitos são recrutados para o local da lesão, como mecanismo de
30 defesa para combater o agente patogênico, o que leva a uma 'explosão respiratória'
31 devido a uma maior captação de oxigênio e, portanto, a uma maior liberação e
32 acúmulo de ERO no local do dano. Esta produção de ERO causada por neutrófilos,
33 monócitos, macrófagos e eosinófilos constitui um mecanismo de defesa muito
34 importante, porém potencialmente perigoso se for ativado de forma inadequada,

1 causando maior dano ao tecido (HALLIWELL, 1997; MANTOVANI et al., 2012;
2 REUTER et al., 2010).

3 Os mecanismos moleculares que medeiam a degradação proteica
4 induzida pelo EO no músculo incluem a ativação do fator-kB nuclear (NF-kB) por ERO,
5 que regula positivamente o sistema ubiquitina-proteassoma e a nitração dos resíduos
6 de tirosina de proteínas, que desencadeiam sua degradação, assim que modificadas
7 (TISDALE., 2002). As proteínas são o principal alvo de dano oxidativo e nitrosativo em
8 células, o que leva obrigatoriamente à perda de sua função bioquímica. Os principais
9 produtos de oxidação irreversível são a hidroxilação e a carbonilação de proteínas
10 (CHONDROGIANNI et al., 2014).

11

12

13 1.5 DEGRADAÇÃO DE PROTEÍNAS

14

15

16 A sinalização intracelular por ERO e ERN contribui para a adaptação
17 do músculo estriado esquelético em resposta ao aumento da atividade contrátil
18 (exercício muscular) e períodos prolongados de desuso muscular. Dependendo do
19 intervalo temporal, a produção de ERO e ERN possui papéis diferentes. A elevação
20 moderada na sua produção pelo músculo esquelético durante um intervalo de tempo
21 curto (minutos) é suficiente para ativar vias de sinalização que levam à adaptação
22 celular. Oposto a isso, a regulação positiva na produção de ERO e ERN durante longo
23 tempo (horas) pode resultar na ativação das vias de sinalização, que ativam a
24 proteólise muscular (POWERS et al., 2010).

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

A degradação de proteínas do músculo esquelético depende da
atividade de três vias proteolíticas: (I) via dependente de calpaínas; (II) via dependente
de caspases; e (III) via dependente do sistema ATP-ubiquitina-proteassoma (UPS).
Este último consiste no principal mecanismo regulador da degradação de proteínas
no músculo esquelético. Evidências apontam para sinalização de ERO na regulação
do sistema UPS. A atividade do sistema proteolítico dependente de proteassoma
depende da disponibilidade de ubiquitina e enzimas envolvidas na ubiquitilação de
substratos proteicos, sendo elas: E1 (enzimas ativadoras de ubiquitina), E2 (enzimas
conjugadoras de ubiquitina) e E3 (ubiquitina ligases). Segundo McCLUNG et al.
(2009), a exposição de miotubos C2C12 ao peróxido de hidrogênio (uma ERO) regula
positivamente a expressão de ligases E3, que são específicas do músculo estriado e

1 são responsáveis pela ligação da proteína danificada ao barril proteolítico (BONALDO
2 et al., 2013; TISDALE, 2005). Os níveis de expressão das E3 ligases específicas do
3 músculo são marcadores moleculares da proteólise dependente de proteassoma e
4 estão relacionados ou acometimento da caquexia em pacientes portadores de câncer
5 (FEARON et al., 2002).

6 As proteínas E3 podem contribuir para a atrofia muscular em
7 condições catabólicas. Estas incluem as proteínas E3 atrogin1 / MAFbx e MuRF1. A
8 expressão de MuRF1 e atrogin1 são reguladas pelos fatores de transcrição Forkhead
9 box O (FOXO). O músculo esquelético expressa três isoformas FOXO: 1, 3 e 4.
10 Quando FOXO é fosforilado por Akt, esses fatores de transcrição são excluídos do
11 núcleo. A inativação de Akt leva a desfosforilação de FOXO, resultando na
12 translocação de FOXO para o núcleo e na ativação transcricional de atrogin1 e
13 MuRF1, confirmando que a translocação de FOXO para o núcleo é necessária para a
14 expressão de atrogin1 e MuRF1, e assim promoção da atrofia muscular (GOMES et
15 al., 2001; POWERS et al., 2016; SANDRI et al., 2004).

16 As calpaínas são proteases ativadas pelo aumento nos níveis
17 citosólicos de cálcio (Ca^{2+}) livre. A produção intracelular de ERO tem papel
18 fundamental nos distúrbios da homeostase do Ca^{2+} . A elevação da concentração de
19 ERO no músculo promove aumento citosólico dos níveis de Ca^{2+} por 3 mecanismos
20 distintos: pela oxidação do canal de Ca^{2+} sensível à rianodina, que resulta na liberação
21 de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (RS); pela inibição da atividade da Ca^{2+} -ATPase
22 – sarcoplasmática, que retarda a recaptção de Ca^{2+} pelo RS; e a formação de
23 aldeídos reativos mediada por ERO pode inibir a atividade Ca^{2+} -ATPase da membrana
24 plasmática (POWERS et al., 2010). A produção de ERO, quando associada à
25 inatividade do músculo esquelético, também pode ativar a via da caspase-3 (marcador
26 clássico de apoptose), por meio das vias de sinalização mitocondrial e do RS, sendo
27 então capaz de promover a degradação dos complexos intactos de actina-miosina,
28 responsáveis pela contração sarcomérica (POWERS et al., 2010; TISDALE., 2004).

29 Os mecanismos citados parecem estar todos envolvidos, de alguma
30 forma não totalmente explicada, em diferentes fases da perda de massa magra
31 durante a evolução da caquexia do câncer.

32

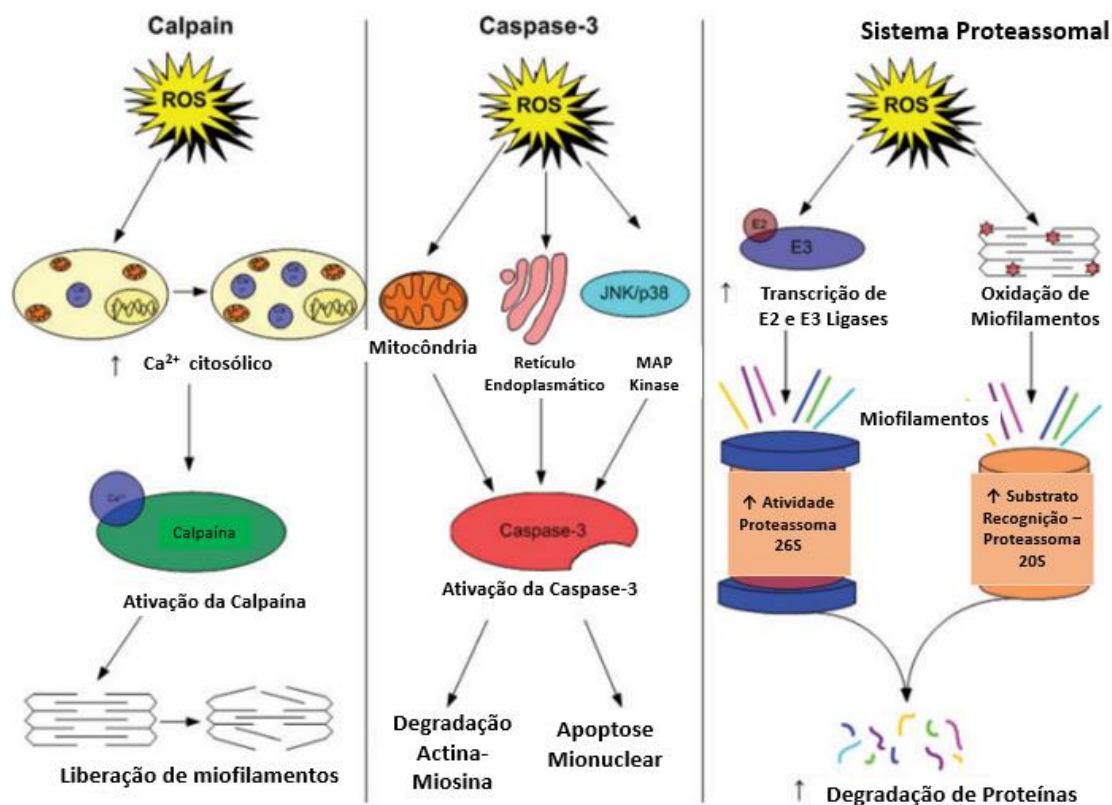


Figura 2. Ativação das vias proteolíticas das calpaínas, caspase-3 e o sistema proteassoma no músculo esquelético por espécies reativas de oxigênio (Adaptado de Powers et al., 2010)

1.6 ESTRUTURA DO MÚSCULO ESQUELÉTICO

O tecido muscular, de origem mesodérmica, pode ser classificado baseado de acordo com suas características morfológicas e funcionais em: tecido muscular estriado esquelético, tecido muscular estriado cardíaco e tecido muscular liso (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013). Em humanos, o músculo esquelético compreende aproximadamente 40% do peso corporal total, contém 50–75% de todas as proteínas do corpo e é responsável por 30–50% do *turnover* de proteínas do corpo inteiro (FRONTERA & OCHALA, 2015).

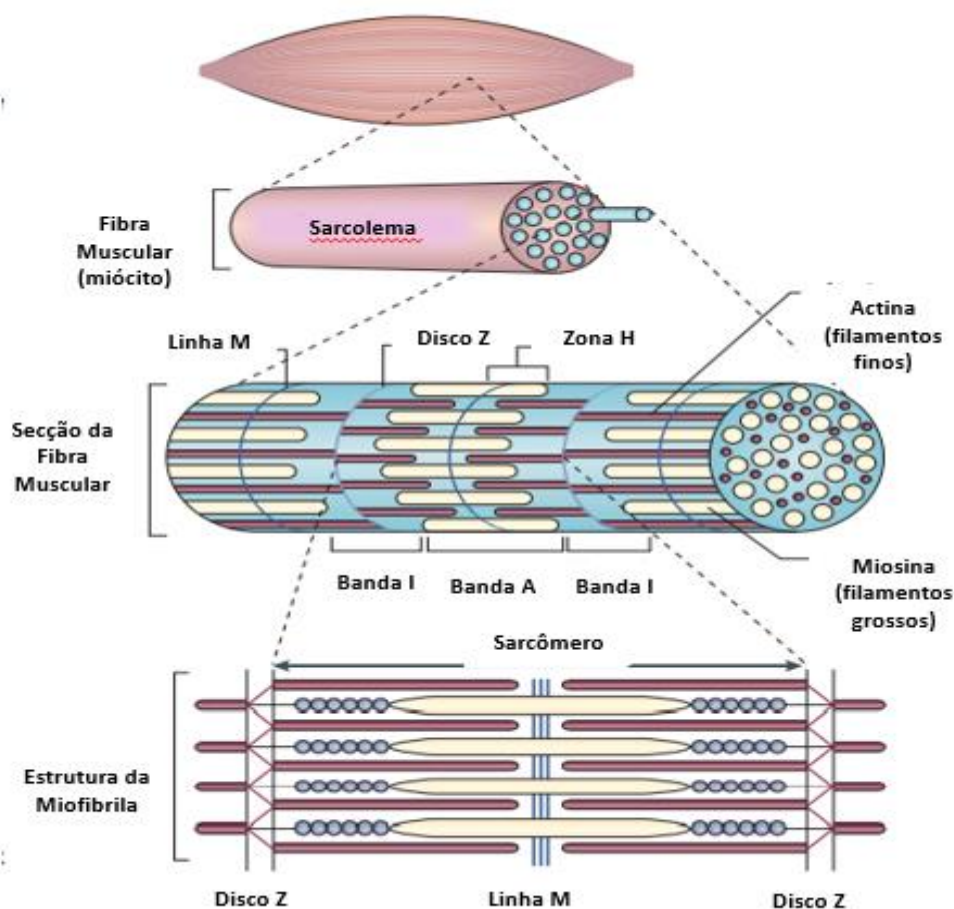
O tecido muscular esquelético é constituído por células cilíndricas multinucleadas alongadas, por isso também chamadas fibras. O diâmetro das fibras musculares varia de 10 a 100 μm e possuem até 30 cm de comprimento, ainda que processos patológicos possam alterar essa relação. Nas fibras musculares esqueléticas, os núcleos se localizam na periferia, em proximidade ao sarcolema (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013).

Os músculos são envolvidos por uma fina camada de tecido conjuntivo, o epimísio; grupos de fibras são dispostas em feixes de fibras e envoltas pelo perimísio;

1 entre cada fibra muscular há uma delicada camada, denominada endomísio
2 (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013). Uma fibra muscular esquelética é delimitada por
3 uma membrana plasmática, o sarcolema, que contém o sarcoplasma, correspondente
4 ao citoplasma das células musculares. Elas apresentam estriações transversais,
5 quando observadas pelo microscópio óptico, pela alternância de faixas claras e
6 escuras. As áreas escuras correspondem à banda A, formada por filamentos grossos
7 (miosina) e finos (actina, tropomiosina e troponina), enquanto as bandas I são as áreas
8 claras, compostas somente por filamentos finos. No centro de cada banda I nota-se
9 uma linha transversal escura, a linha Z. A estriação da miofibrila é devido à repetição
10 de unidades iguais, os sarcômeros, que medem aproximadamente 2,5 μm , e são
11 formados pela parte da miofibrila que fica entre duas linhas Z sucessivas e conta com
12 a presença de uma banda A separando duas semibandas I. A banda A apresenta uma
13 zona mais clara em seu centro, a banda H. Da linha Z, partem os filamentos finos, que
14 se dispõem até a borda externa da banda H, formada somente por filamentos grossos.
15 Na região central da banda H está a linha M, que faz as ligações laterais entre
16 filamentos grossos vizinhos. Os filamentos grossos estão na região central do
17 sarcômero, e na região lateral da banda A (ARGILÈS et al., 2014; JUNQUEIRA
18 & CARNEIRO, 2013).

19 Quando um sarcômero se contrai, ocorre o deslizamento de
20 filamentos finos e grossos, conseqüentemente os discos Z se aproximam e a banda I
21 torna-se menor. A banda A permanece com a mesma largura. Na contração total, os
22 filamentos finos e grossos se sobrepõem (Figura 3) (ARGILÈS et al., 2014,
23 JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013).

24



1

2 **Figura 3:** Organização do Músculo Esquelético (Adaptado de Argiles et al., 2014).

3

4

5 O músculo esquelético contribui significativamente para múltiplas
6 funções corporais, sendo capaz de converter energia química em mecânica, a fim de
7 gerar força e potência, manutenção da postura corporal e produzir movimentos
8 funcionais. Está envolvido também no metabolismo energético basal, serve de
9 armazenamento de substratos como aminoácidos e carboidratos, manutenção da
10 temperatura corporal e é combustível utilizado durante os exercícios e atividades
11 físicas. A reserva de aminoácidos no músculo esquelético é necessária para que
12 aconteça a síntese de proteínas de outros órgãos como pele, cérebro e coração, e a
13 liberação de aminoácidos do músculo contribui para a manutenção dos níveis de
14 glicose no sangue durante condições de fome (FRONTERA & OCHALA, 2015).
15 Portanto, reduzida massa muscular prejudica a capacidade de resposta a situações
16 de estresse e doenças crônicas. Este fato tem sido extensivamente demonstrado em
modelos experimentais de caquexia do câncer.

1 Cada músculo esquelético é composto por uma porcentagem variada
2 de fibras musculares de contração lenta (tipo I) e de contração rápida (tipo II),
3 responsáveis por contribuírem para a resistência prolongada ou impulsos poderosos
4 de movimento, respectivamente (HALL, 2017). Abaixo, são apresentadas as
5 características de cada tipo. Em modelos experimentais que utilizam roedores, os
6 músculos extensor longo dos dedos (EDL) e sóleo (SOL) são representantes de
7 músculos de contração rápida e contração lenta, respectivamente, enquanto o
8 músculo gastrocnêmio de roedores é composto pelos dois tipos de fibras,
9 apresentando porções do tipo I e II, e o tibial anterior é caracterizado pela
10 predominância de fibras de contração rápida (ALVES, 2010; BOTINELLI & REGGIANI,
11 2000; JÜRGENS 2002).

12

13 1.6.1 Fibras de Contração Lenta (TIPO I)

14

15 As fibras de contração lenta, com resistência à fadiga, possuem
16 menor diâmetro quando comparadas às fibras de contração rápida. Possuem também
17 um sistema de vascularização mais extenso e mais capilares, a fim de que haja
18 suprimento suficiente de oxigênio ao tecido. Devido ao metabolismo
19 predominantemente oxidativo, contém grande quantidade de mioglobina, recebendo
20 também o nome de fibras vermelhas. As fibras de contração lenta possuem um
21 número grande de mitocôndrias, o que confere alta capacidade oxidativa ao tecido e
22 a sustentação de demandas energéticas a longo prazo, assim como um nível basal
23 maior de espécies reativas de oxigênio e capacidade antioxidante (HALL, 2017;
24 FRONTERA & OCHALA, 2015; BORDEAU-JULIEN et al., 2018; SCHIAFFINO et al.,
25 2013).

26

27 1.6.2 Fibras de Contração Rápida (Tipo II)

28

29 Em comparação às fibras de contração lenta, as fibras de contração
30 rápida apresentam o RS mais extenso e grandes quantidades de enzimas glicolíticas.
31 Possuem um suprimento sanguíneo de extensão menor, devido à importância
32 secundária do metabolismo oxidativo. Apresentam também menor número de
33 unidades mitocondriais (HALL, 2017; SCHIAFFINO et al., 2013).

1 Nas fibras de contração rápida, há ainda a existência de dois tipos de
2 unidades motoras de contração, são elas as fibras tipo 2A e 2B. Ambas apresentam
3 altos níveis de enzimas glicolíticas. As fibras 2A são resistentes à fadiga, com
4 metabolismo glicolítico oxidativo e propriedades metabólicas intermediárias, e as
5 fibras 2B são de fadiga rápida, metabolismo glicolítico e fadigáveis (FRONTERA &
6 OCHALA, 2015; GALPIN et al., 2012; SCHIAFFINO & REGGIANI, 2011). Em
7 camundongos, há ainda as fibras 2X, que possuem propriedades de contração (tempo
8 de contração e relaxamento), e resistência à fadiga intermediárias entre a das
9 unidades 2A e 2B (SCHIAFFINO & REGGIANI, 2011).

12 1.6.3 Contração Muscular

14 A contração do músculo esquelético é da responsabilidade de duas
15 estruturas, as unidades de liberação de cálcio, as tríades (ou CRU), e as
16 mitocôndrias (ROSSI et al., 2009). As CRU são o local onde o acoplamento excitação-
17 contração (EC) acontece, processo pelo qual um potencial de ação que viaja ao longo
18 da membrana do túbulo transverso (TT) desencadeia a liberação de Ca^{2+} do RS
19 (PIETRANGELO et al., 2015; ROSSI et al., 2009).

20 O RS é um sistema refinado e organizado de membranas que
21 funciona como o principal local de armazenamento de Ca^{2+} do músculo esquelético. É
22 composto por dois compartimentos: as cisternas terminais do RS ou *SR junctional*
23 (jSR), e o RS longitudinal (SRI). As jSR contêm os receptores de rianodina (RyR1 ou
24 canais de liberação de Ca^{2+}), e calsequestrina (CASQ), proteína que acumula Ca^{2+}
25 nas proximidades dos canais de liberação. As proteínas RyR1 estão dentro de jSR em
26 ambos os lados do túbulo T (TT). Dentro destas matrizes RyR1, todos os outros canais
27 de liberação de Ca^{2+} estão associados a uma "tétrade" de quatro dihidropiridinas
28 (receptores da membrana de TúbuloT-DHPRs) na membrana do TT. A associação de
29 um TT com jSR, é referida como unidade de liberação de Ca^{2+} (CRU) ou tríade, que
30 são junções intracelulares especializadas, e onde a EC acontece (BONCOMPAGNI et
31 al., 2009; BONCOMPAGNI et al., 2019; PIETRANGELO et al., 2015; PIETRANGELO
32 2019; ROSSI et al., 2009) (Figura 3). Já as membranas RSI são ricas em retículo
33 sarcoplasmático- Ca^{2+} ATPases (SERCA), que removem rapidamente o

1 Ca^{2+} citosólico liberado pelas RyR durante a EC para repô-lo no lúmen do RS após
2 cada contração (BONCOMPAGNI et al., 2019) (Figura 3).

3 As mitocôndrias são responsáveis pela produção aeróbica de ATP
4 necessária para o ciclo da ponte cruzada de actina/miosina e para a recaptação de
5 Ca^{2+} pelas SERCA durante os ciclos de contração/relaxamento já citados. A
6 sinalização entre o RS e as mitocôndrias no músculo esquelético é mediada por uma
7 comunicação do RS para a mitocôndria, que envolve a ativação da produção de ATP
8 dependente de Ca^{2+} , e da mitocôndria para o RS, que envolve a supressão da
9 liberação de Ca^{2+} do RS (PIETRANGELO et al., 2019; QAISAR et al., 2021; ROSSI et
10 al., 2009).

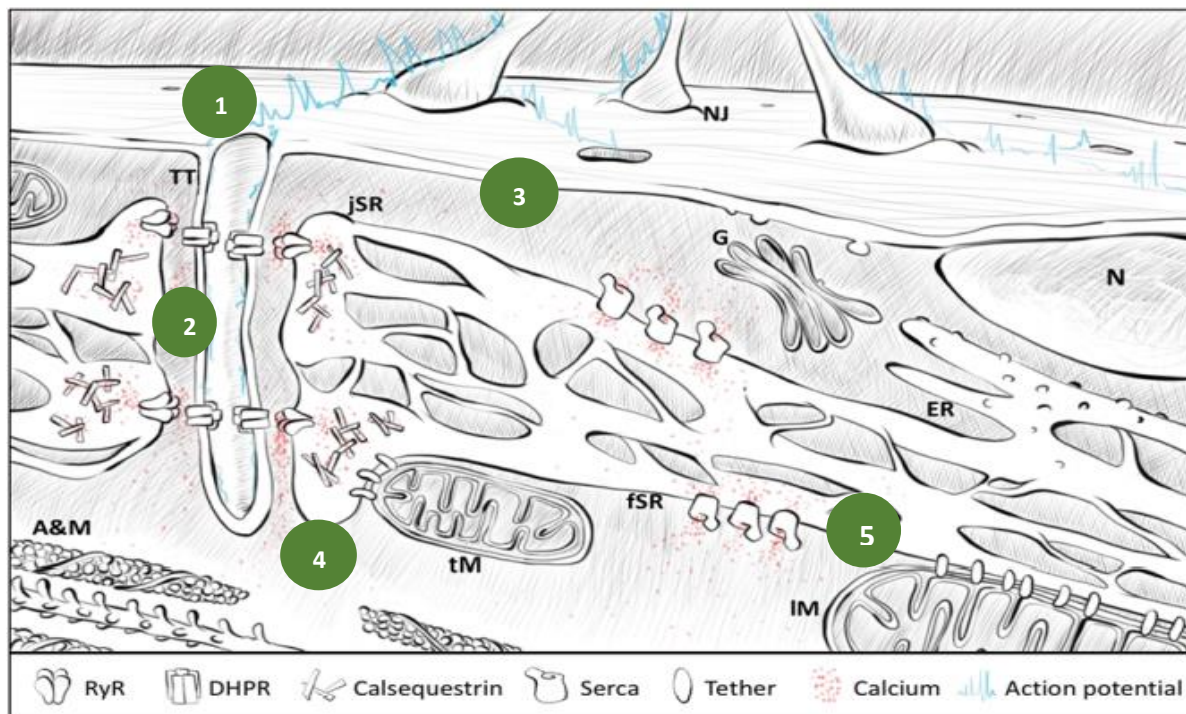
11 A atividade reduzida da SERCA está envolvida na diminuição
12 dos estoques de Ca^{2+} do SR, o que compromete a quantidade de Ca^{2+} liberado
13 através dos canais RyR1 para contração durante a ativação muscular. A redução da
14 captação de Ca^{2+} pelo RS leva a um maior acúmulo de Ca^{2+} no citosol, o que pode
15 trazer malefícios, incluindo a ativação da proteólise mediada por Ca^{2+} . O
16 Ca^{2+} citosólico regulado positivamente reduz a sensibilidade do aparelho contrátil ao
17 Ca^{2+} , quebra a homeostase mitocondrial e ativa vários processos catabólicos,
18 contribuindo para a perda de massa e força muscular (BONCOMPAGNI et al., 2019;
19 PIETRANGELO et al., 2019).

20 Em um modelo de caquexia induzida pelo carcinosarcoma mamário
21 de Ehrlich, proposto por nosso grupo (BORDINI et al., 2020), a proteína SERCA
22 mostrou estar diminuída no grupo caquexia quando comparado com o grupo controle,
23 em músculo EDL, 28 dias após a inoculação s.c. da forma sólida do tumor. Em estágio
24 precoce da caquexia induzida por tumor Walker-256, as proteínas SERCA1, CASQ1
25 e RYR1, mostraram-se também diminuídas (BLEGNISKI et al., 2021 em preparação).

26 O desequilíbrio de Ca^{2+} pode ser o responsável pela atrofia muscular,
27 como demonstrado por WU et al. (2012), que relataram aumento de 330%
28 na concentração intracelular de Ca^{2+} em repouso no músculo sóleo de ratos após 14
29 dias de suspensão do membro posterior. Já COSTELLI et al. (2001) avaliaram o
30 estado do sistema proteolítico dependente de Ca^{2+} no músculo gastrocnêmio de ratos
31 portadores do hepatocarcinoma AH-130, avaliando a atividade da calpaína, os níveis
32 de calpastatina e de Ca^{2+} ATPase. Após a inoculação do tumor, a atividade proteolítica
33 dependente de Ca^{2+} diminuiu, enquanto notou-se alteração da forma da membrana
34 onde estava localizada a SERCA. Os dados sugeriram pela primeira vez que o RS

1 pode desempenhar um papel na ativação da resposta hipercatabólica da proteína
 2 muscular que caracteriza a caquexia do câncer.

3



4

5 **Figura 4:** Acoplamento Excitação-Contração. Adaptado de Boncompagni et al., 2019. **1)** O potencial de
 6 ação é disparado; **2)** a despolarização do TT é detectada pelo seu receptor, a DHPR; **3)** a DHPR está
 7 em contato físico próximo com RyR1 jSR que, por sua vez, também está conectada com mitocôndrias
 8 triádicas (tM); **4)** RyR1 abre e o Ca²⁺ sai do RS; **5)** as bombas SERCA estão distribuídas no RSI e
 9 promovem a recaptação de Ca²⁺ pelo RS.

10

11 Considerando todo o exposto, a caquexia pelo câncer é uma
 12 síndrome multifatorial complexa, caracterizada por perda involuntária e patológica de
 13 massa corporal, principalmente devido à perda de massa muscular esquelética e
 14 frequentemente associada à fadiga intensa. Estes efeitos costumam ser
 15 responsabilizados por diminuir a qualidade de vida e a sobrevivência de pacientes. As
 16 estatísticas apontam para a caquexia como causa direta de morte para 40% de todos
 17 os pacientes com câncer (WARREN, 1932). Quanto à fisiopatologia da síndrome, a
 18 maior parte dos dados disponíveis na literatura é obtida por meio de estudos pré-
 19 clínicos, realizados com modelos experimentais de câncer muito diversos, mais
 20 frequentemente em estágios avançados de caquexia. Os modelos mais estudados e
 21 melhor descritos mostram diminuição da área de seção transversal das fibras
 22 musculares, sendo mais provável que essa atrofia afete as fibras do tipo II. Além disso,

1 a ultraestrutura do músculo esquelético parece estar prejudicada. Vários estudos têm
2 sugerido uma associação entre disfunção mitocondrial e atrofia do músculo
3 esquelético por meio de distúrbios em sua dinâmica, qualidade e função. Estas
4 mudanças precederiam a perda muscular, enquanto a mitofagia (BROWN et al., 2017)
5 estaria presente em estágios posteriores. O estresse oxidativo, que está relacionado
6 à proteólise e atrofia das miofibrilas em diferentes estágios de caquexia (GUARNIER
7 et al., 2010), é apontado como responsável pelas modificações mitocondriais (DOLLY
8 et al., 2020). Nos últimos anos, nosso grupo tem se dedicado a investigar modificações
9 oxidativas e ultraestruturais na mitocôndria e no retículo sarcoplasmático (RS) e
10 correlacionar com a perda muscular nos músculos glicolíticos e oxidativos em um
11 estágio precoce (BLEGNISKI et al., 2019) da caquexia induzida por um
12 carcinosarcoma de mama. Dados coletados recentemente mostram que, em um
13 estágio muito inicial de um modelo experimental de caquexia induzida por
14 carcinosarcoma mamário de Walker, em ratos: 1) os músculos glicolíticos já estão
15 mais sujeitos a perda de massa, mas independentemente da oxidação de proteínas;
16 2) as fibras glicolíticas já são sensíveis às alterações mitocôndrias e alterações
17 estruturais do RS; 3) esses parâmetros são diretamente correlacionados às
18 modificações oxidativas das membranas; e 4) os músculos oxidativos não são
19 preservados de danos oxidativos e estruturais. Acreditamos que esses novos dados
20 trazem à tona uma ferramenta útil para combater essa síndrome devastadora. No
21 entanto, vários são os modelos experimentais utilizados na literatura, que possuem
22 evolução e comportamento indutor de caquexia diversos, o que poderia também
23 causar efeitos diferentes sobre o músculo estriado esquelético e o estado de
24 fadiga/funcional.

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

2 JUSTIFICATIVA

A caquexia do câncer é uma síndrome complexa e multifatorial, de grande importância clínica e científica, visto que a quantidade de massa muscular e adiposa presentes nos indivíduos interfere diretamente no tratamento, qualidade e expectativa de vida, pois, além de reduzir as funções físicas, reduz a tolerância à terapia anticâncer e à redução da reserva energética, levando a mau prognóstico. Sabe-se que tumores diferentes possuem crescimento e comportamentos diferentes, alguns sendo mais agressivos na indução da caquexia, enquanto outros não. É de extrema importância a condução de estudos envolvendo diferentes modelos experimentais para indução de caquexia, para consequente compreensão e elucidação de mecanismos envolvidos durante todo o desenvolvimento desta síndrome, induzida por diferentes tumores, incluindo a evolução da diminuição de capacidades físicas que influenciem na qualidade de vida. Este trabalho se propõe a esclarecer os possíveis mecanismos envolvidos na qualidade da perda de massa e atividade, em um modelo de caquexia induzido por carcinoma de cólon murino C26, através de análises bioquímicas, metabólicas e funcionais do músculo.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Diferenciar os efeitos da caquexia em diferentes tipos de fibras musculares esqueléticas, em tempos experimentais distintos, bem como o envolvimento de alterações bioquímicas, oxidativas e funcionais em um modelo experimental de carcinoma colorretal (C26).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar se o tumor de cólon murino C26 é capaz de induzir caquexia cumprindo os parâmetros, como perda de massa corpórea, perda de função muscular, diminuição no apetite e alterações metabólicas, permitindo a sua classificação no tempo;
- Verificar a participação do estresse oxidativo e os possíveis danos provocados nos tempos experimentais estudados;
- Avaliar o processo inflamatório sistêmico através da dosagem da citocina IL-6 no plasma;
- Averiguar a existência de mudanças de estrutura adaptativa muscular glicolítica e oxidativa;
- Verificar se existe alteração na capacidade funcional e física através de testes funcionais e metabólicos.

1 Os dados colhidos durante a fase experimental da elaboração desta dissertação
2 deram origem a um artigo científico, intitulado de: ***Evaluation of muscle loss quality***
3 ***and functional parameters during the progression of cachexia induced by***
4 ***colonrectal carcinoma C26.***

5

6

7 Revista proposta:

8 ***Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle***

9 IF 2019-2020: 9.802

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

- 1
2 BONCOMPAGNI S, et al. Mitochondria are linked to calcium stores in striated muscle
3 by developmentally regulated tethering structures. **Molecular Biology of the Cell**, v.
4 20, p. 1058-1067, 2009.
- 5
6 BONCOMPAGNI S, et al. Physical and Functional Cross-Talk Between Endo-
7 Sarcoplasmic Reticulum and Mitochondria in Skeletal Muscle. **Antioxidants and**
8 **Redox Signaling**, v. 32, p. 1-32, 2019.
- 9
10 BORDINI HP. Análise da Perda de Força e de Massa Muscular na Síndrome da
11 Caquexia induzida pela forma sólida do Adenocarcinoma de Ehrlich. Tese de
12 Doutorado, Universidade Estadual de Londrina, 2020.
- 13
14 BOURDEAU-JULIEN I, et al. Metabolic Networks Influencing Skeletal Muscle Fiber
15 Composition. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 6, p. 1-6, 2018.
- 16
17 BOTTINELLI R & REGGIANI M. Human skeletal muscle Fibres: molecular and
18 functional diversity. **Progress in Biophysics & Molecular Biology**, v. 73, p. 195-262,
19 2000.
- 20
21 BRENNER H & KLOOR M & PETER POX C. Colorectal câncer. **Lancet**, v. 383, p.
22 1490-1502, 2014.
- 23
24 BRONW JL, et al. , (2017) Mitochondrial degeneration precedes development of
25 muscle atrophy in progression of cancer cachexia. **Journal Cachexia Sarcopenia**
26 **Muscle**, v. 8, p. 926-938, 2017.
- 27
28 BUSQUETS S, et al. Staging cachectic cancer patients using the cachexia score
29 (CASCO). Communication 303. Abstracts of the 7^o Cachexia conference, Kobe/Osaka,
30 Japan, **J. Cachexia, Sarcopenia Muscle**, 2013.
- 31
32 CHONDROGIANNI N, et al. Protein damage, repair and proteolysis. **Molecular**
33 **Aspects of Medicine**, v. 35, p. 1-71, 2014.
- 34
35 Consenso Brasileiro de Caquexia e Anorexia em cuidados paliativos. **Revista**
36 **Brasileira de Cuidados Paliativos**, 2011.
- 37
38 COSTELLI P, et al. Activation of Ca²⁺-dependent proteolysis in skeletal muscle and
39 heart in cancer cachexia. **British Journal of Cancer**, v. 84, p. 946–950, 2001.
- 40
41 COSTELLI, P.; BACCINO, F. M. Mechanisms of skeletal muscle depletion in wasting
42 syndrome: role of ATP-ubiquitin-dependent proteolysis. **Current opinion in clinical**
43 **nutrition and metabolic care**, v. 6, p. 407-412, 2003
- 44
45 DALLE-DONNE, I. et al. Actin carbonylation: from a simple marker of protein oxidation
46 revealing signs of severe functional impairment. **Free radical biology and medicine**,
47 v. 31, p. 1075-1083, 2001.
- 48
49 DAS SK, et al. Adipose Triglyceride Lipase Contributes to Cancer-Associated
50 Cachexia. **SCIENCE**, v. 333, p. 233-238, 2011.

- 1
2 DOLLY A, DUMAS J-F & SERVAIS S. Cancer cachexia and skeletal muscle atrophy
3 in clinical studies: what do we really know? **Journal Cachexia Sarcopenia Muscle**,
4 v. 11, p. 1413-1428, 2020.
- 5
6 FEARON KCH & MOSES AGW. Cancer cachexia. **International Journal of**
7 **Cardiology**, v. 85, p. 73–81, 2002.
- 8
9 FEARON K, et al. Definition and classification of cancer cachexia: an international
10 consensus. **Lancet Oncology**, v. 12, p. 489–95, 2011.
- 11
12 FEARON KCH, et al. Cancer Cachexia: Mediators, Signaling, and Metabolic
13 Pathways. **Cell Metabolism**, v. 16, p. 153-166, 2012.
- 14
15 FRONTERA WR & OCHALA J. Skeletal Muscle: A Brief Review of Structure and
16 Function, v. 96, p. 183-195, 2015.
- 17
18 GALPIN AJ, et al. Human Skeletal Muscle Fiber Type Specific Protein Content.
19 **Analytical Biochemistry**, 2012.
- 20
21 GIRALT M & VILLARROYA F. White, brown, beige/brite: different adipose cells for
22 different functions? **Endocrinology**, v.154, p. 2992–3000, 2013.
- 23
24 GOMES MD, et al. Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during
25 muscle atrophy. **PNAS**, v. 98, p. 14440–14445, 2001.
- 26
27 GUARNIER FA. Participação do Estresse Oxidativo como modulador do processo de
28 perda de Massa Muscular na Caquexia induzida por Tumor de Walker-256. Tese de
29 Doutorado, Universidade Estadual de Londrina, 2010.
- 30
31 GUARNIER FA, et al. Time course of skeletal muscle loss and oxidative stress in rats
32 with Walker-256 solid tumor. **Muscle Nerve**, v. 6, p. 950-958, 2010
- 33
34 HALL, JE. GUYTON e HALL: Tratado de fisiologia médica. 13.^a edição. Rio de Janeiro:
35 Elsevier, 2017.
- 36
37 HALLIWELL B, et al. Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford, 2010.
- 38
39 HALLIWELL B. Antioxidants and Human Disease: A General Introduction. **Nutrition**
40 **Reviews**, v. 55, p. 44-49, 1997.
- 41
42 Instituto Nacional do Câncer (INCA) – Câncer de Intestino. Disponível em:
43 <<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-intestino>>. Acesso em 12 de
44 maio de 2021.
- 45
46 Instituto Nacional do Câncer (INCA). Disponível em: <
47 <https://www.inca.gov.br/estimativa/introducao>>. Acesso em 20 de julho de 2021.
- 48
49 INUI A. Cancer anorexia-cachexia syndrome: current issues in research and
50 management. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 52, p. 72-91, 2002.

- 1
2 JUNQUEIRA LC & CARNEIRO J. Histologia básica. 12.^a ed. Rio de Janeiro:
3 Guanabara Koogan, 2013.
4
- 5 JÜRGENS KD. Etruscan shrew muscle: the consequences of being small. **Journal of**
6 **Experimental Biology**, v. 205, p. 2161-2166, 2002.
7
- 8 LEBLANC TW, et al. Correlation Between the International Consensus Definition of
9 the Cancer Anorexia-Cachexia Syndrome (CACS) and Patient-Centered Outcomes in
10 Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. **Journal of Pain and Symptom Management**,
11 v. 49, p. 680-689, 2014
12
- 13 MANTOVANI G, et al. Cachexia and Oxidative Stress in Cancer: An Innovative
14 Therapeutic Management. **Pharmaceutical Design**, v. 18, p. 4814-4818, 2012.
15
- 16 McCLUNG JM, et al. Calpain-1 is required for hydrogen peroxide-induced myotube
17 atrophy. **American Journal Physiology Cell Physiology**. v. 296, p. 363-371, 2009.
18
- 19 Oncoguia - Estatística para Câncer Colorretal. Disponível em:
20 <<http://www.oncoguia.org.br/conteudo/estatistica-para-cancer-colorretal/7284/178/>>.
21 Acesso em 12 de maio de 2021.
22
- 23 PIETRANGELO L, et al. Age-dependent uncoupling of mitochondria from Ca²⁺
24 release units in skeletal muscle. **Oncotarget**, v. 6, p. 35358–35371, 2015.
25
- 26 PIETRANGELO L, et al. Muscle activity prevents the uncoupling of mitochondria from
27 Ca²⁺ Release Units induced by ageing and disuse. **Archives of Biochemistry and**
28 **Biophysics**, v. 15, p. 22-33, 2019.
29
- 30 PORPORATO PE. Understanding cachexia as a cancer metabolism syndrome.
31 **Oncogenesis**, v. 5, p. 1-10, 2016.
32
- 33 POWERS SK, et al. Reactive oxygen species are signaling molecules for skeletal
34 muscle adaptation. **Experimental Physiology**, v. 95, p. 1-9, 2010.
35
- 36 POWERS SK, et al. Redox control of skeletal muscle atrophy. **Free Radical Biology**
37 **& Medicine**, v. 98, p. 1-25, 2016.
38
- 39 QAISAR R, et al. Restoration of Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺ ATPase (SERCA)
40 Activity Prevents Age-Related Muscle Atrophy and Weakness in Mice. **International**
41 **Journal of Molecular Sciences**, v. 22, p. 1-13, 2021.
42
- 43 REUTER S, et al. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked?
44 **Free Radical Biology Medicine**, v. 49, p. 1603-1616, 2010.
45
- 46 ROSSI A, et al. Sarcoplasmic Reticulum-Mitochondrial Symbiosis: Bidirectional
47 Signaling in Skeletal Muscle. **Exercise and Sport Sciences Reviews**, v. 37, p. 29-
48 35, 2009.
49

- 1 SANDRI M et al. Foxo Transcription Factors Induce the Atrophy-Related Ubiquitin
2 Ligase Atrogin-1 and Cause Skeletal Muscle Atrophy. **Cell**, v. 117, p. 399-412, 2004.
3
- 4 SCHIAFFINO S & REGGIANI C. Fiber Types in Mammalian Skeletal Muscles
5 **Physiological Reviews**, v. 91, p. 1447–1531, 2011.
6
- 7 SCHIAFFINO S, et al. Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy.
8 **FEBS Journal.**, v. 280, p. 4294-4314, 2013.
9
- 10 SCHNEIDER CD & OLIVEIRA AR. Radicais livres de oxigênio e exercício:
11 mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Revista Brasileira de**
12 **Medicina do Esporte**, v. 10, p. 308-313, 2004.
13
- 14 SHIVAPPA N, et al. Dietary Inflammatory Index and Colorectal Cancer Risk: A Meta-
15 Analysis. **Nutrients**, v. 9, p. 1-17, 2017.
16
- 17 SILVA SP, et al. Cancer cachexia and its pathophysiology: links with sarcopenia,
18 anorexia and astenia. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 11, p. 619-
19 635, 2020.
20
- 21 STEWART GD, et al. Cancer cachexia and fatigue. **Clinical Medicine Journal**, v. 6,
22 p. 140-143, 2006.
23
- 24 THANIKACHALAM K & KHAN G. Colorectal Cancer and Nutrition. **Nutrients**, 2019.
25
- 26 TISDALE MJ. Cachexia in cancer patients. **Nature**, v. 2, p. 862-871, 2002.
27
- 28 TISDALE MJ. Cancer cachexia., 389: 299–305, 2004.
29
- 30 TISDALE MJ. Molecular Pathways Leading to Cancer Cachexia. **Physiology**, v. 20, p.
31 340–348, 2005.
32
- 33 TISDALE MJ. Catabolic mediators of cancer cachexia. **Current Opinion in Supportive**
34 **and Palliative Care**, v. 2, p. 256-261, 2008.
35
- 36 VANDERVENN BN, et al. Disrupted Skeletal Muscle Mitochondrial Dynamics,
37 Mitophagy, and Biogenesis during Cancer Cachexia a Role for inflammation.
38 **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 1, p. 1-14, 2017.
39
- 40 VAUGHAN VC, et al. Cancer cachexia: impact, mechanisms and emerging treatments.
41 **Journal Cachexia Sarcopenia Muscle**, v. 4, p. 95-109, 2013.
42
- 43 WARREN S. The immediate causes of death in cancer. **The American Journal of**
44 **the Medical Sciences**, v.184, p. 610-615, 1932.
45
- 46 WU X, et al. Effects of tetramethylpyrazine on nitric oxide synthase activity and
47 calcium ion concentration of skeletal muscle in hindlimb unloading rats. **Zhong hua**
48 **yi xue za zhi**, v. 92, p. 2075–2077, 2012.
49

ANEXO 1

Evaluation of the muscle loss quality and functional parameters during the progression of cachexia induced by colorectal carcinoma C26.

Maria Isabel Faustinoni Bruno¹, Hannah Hamada Mendonça Lens¹, Erika Yumi Yamaguchi¹,
Heloíza Paranzini Bordini¹, Fernanda Paschoal Blegniski¹, Flávia Alessandra Guarnier¹.

¹Laboratory of Pathophysiology and Muscle Adaptation, Department of General Pathology, Londrina State University, Londrina, Brazil.

Revista proposta:

Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle

As normas da revista podem ser visualizadas em:

<https://onlinelibrary.wiley.com/page/journal/1353921906009/homepage/ForAuthors.html>

*Todos os dados são provenientes da confecção da presente dissertação. Esta formatação é uma prévia do artigo.

1 **Evaluation of muscle loss quality and functional parameters during the progression of**
2 **cachexia induced by colorectal carcinoma C26.**

3

4 Maria Isabel Faustinoni Bruno¹, Hannah Hamada Mendonça Lens¹, Erika Yumi Yamaguchi¹,
5 Heloíza Paranzini Bordini¹, Fernanda Paschoal Blegniski¹, Flávia Alessandra Guarnier¹.

6

7 ¹Laboratory of Pathophysiology and Muscle Adaptation, Department of General Pathology,
8 Londrina State University, Londrina, Brazil.

9

10

11

12

13

14

15

16 ***Correspondent author:**

17 Flávia A. Guarnier, PhD

18 Dept of General Pathology

19 Londrina State University,

20 Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445, km 380,

21 Campus Universitário

22 e-mail: faguarnier@uel.br

23 Phone/Fax +55-43-33714267

24 86051-990 Londrina, Brazil

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

35

36

37

Abstract

Introduction: Cachexia can be considered an adverse effect of cancer, often associated with reduced physical function and impaired quality of life. Intense muscle loss results from an imbalance between protein synthesis and degradation, and the involvement of oxidative stress. During the atrophy process, glycolytic or oxidative muscle fibers can respond differently. In this study, we evaluate the experimental model of cachexia induced by C26 tumor, analyzing effects in different fiber types of diverse time points, as well as the involvement of biochemical, oxidative, and functional alterations in the syndrome. **Materials and methods:** Balb-c mice (5-6 weeks old) were inoculated s.c. with 1×10^5 C26 cells at the dorsal region and followed by 7 (Pcaq) and 14 days (Caq), in parallel to their respective controls, inoculated with 200 μ L of PBS. Cachexia was initially classified using daily registers of strength, food consumption, weight, and core temperature. Soleus (SOL), extensor digitorum longus (EDL), gastrocnemius (GAST), and tibialis anterioris muscles were collected to evaluation of different fiber types at distinct time-points. Atrophy, proteolysis, structural modifications, calcium and CK systemic release, protein and lipid oxidation were assayed besides functional parameters. **Results:** Pcaq (0.21 ± 0.036) and Caq (-1.7 ± 0.17 g) differed significantly in weight loss when compared to their controls (0.67 ± 0.21 and 0.25 ± 0.12 g). Only Caq presented significant changes in strength (-8 ± 2.7 g) and food consumption (3.93 ± 0.37 g). In relation to loss of lean mass, muscle atrophy starts early in SOL (7 and 14 days), and later in EDL (14 days). Protein oxidation levels were significantly increased in EDL muscle at Pcaq ($455.5 \pm 7,725$) and in the SOL muscle at Caq ($530.9 \pm 6,642$ nmol/mg protein), oxidative modification to membranes presented significantly differences in relation to controls groups at both time-points. Function was significantly impaired in Caq, showing significant increase in immobility in forced swim test (91 ± 9.7 s). **Conclusions:** The model of cachexia induced by C26 presents a condition of pre-cachexia at 7, and cachexia at 14 days after inoculation. Oxidative modifications to membranes are present at early stage in glycolytic fibers, coinciding with atrophy. Oxidative fibers are early affected and clearly present different mechanisms of muscle loss induction. Both wastes interfere in fatigability, demonstrating that diverse tumors differentially lead to qualitative muscle mass loss over time. These data open the possibility of specific therapeutic effects to treat this devastating syndrome.

Key words: cachexia, cancer, muscle mass, oxidative stress, skeletal muscle fibers.

1 Introduction

2 Cachexia is considered an adverse effect of cancer, often associated with reduced
3 physical function, impaired quality of life, low tolerance to therapies, and decreased survival,
4 which can be the direct cause of death of up to 40% of patients [1]. It is defined as a
5 multifactorial syndrome characterized by a continuous loss of skeletal muscle mass (with or
6 without loss of fat mass) that cannot be completely reversed by conventional nutritional support
7 and leads to progressive functional impairment [2].

8 Most of the data available in literature is obtained through preclinical studies, which are
9 carried out with very different experimental cancer models, most frequently at advanced
10 cachexia stages. During atrophy developed in cachexia, muscle loss can be related with tumor
11 size, tumor metabolism, oxidative status, and many other metabolic factors. The most studied
12 and best described models show decreasing cross-sectional area of muscle fibers, and this
13 atrophy is more likely to affect type II fibers, but fast-twitch or slow-twitch fiber may also present
14 different qualitative responses. In the cachexia experimental model of Lewis lung carcinoma
15 (LLC), for example, glycolytic fibers were more susceptible to atrophy in comparison to
16 muscles with predominance of oxidative fibers [3]. In addition, skeletal muscle ultrastructure
17 appears to be impaired. Studies have suggested an association between mitochondria
18 dysfunction and skeletal muscle atrophy through disturbances in its dynamics, quality and
19 function. These changes would precede muscle loss, while mitophagy [4] would be present at
20 later stages. The oxidative stress, that is related to myofibrils proteolysis and atrophy at
21 different cachexia stages [5], is commonly pointed out as mitochondrial modifications
22 responsibility [6,7].

23 Intense muscle loss results from an imbalance between protein synthesis and
24 degradation, being the degradation significantly increased by a variable combination of
25 reduced food intake and abnormal metabolism, which can be attributed to the body's
26 responses to tumour, such as the production of pro-inflammatory cytokines and induction of
27 proteolysis [8-10]. The cytokines Interleukin-1 β (IL-1 β) and tumor necrosis factor alpha (TNF-
28 α) are involved in cachexia, increasing levels of the corticotropin-releasing hormone (CRH), a
29 neurotransmitter, which suppresses food intake [11]. High levels of interleukin-6 (IL-6) in
30 colorectal carcinoma may result in increased proteolysis and atrophy of skeletal muscle, as
31 well as decreased food intake, making the IL-6 a sensitive predictor of weight loss. [12-13].

32 In addition to the above mentioned, the involvement of oxidative stress in activation of
33 different mechanisms of protein degradation during atrophy in cancer has been strongly proven
34 and reinforced in recent years [5]. Oxidative damage markers (such as carbonylated proteins)

1 are increased in skeletal muscle and are correlated with muscle proteolysis [14]. Besides, the
2 role of calcium has been widely discussed, mainly in aspects related to the induction of muscle
3 loss. In cancer cachexia, the ATPases sarco/endoplasmic reticulum (SERCA) activity - a
4 protein that acts on Ca^{2+} reuptake during the muscle contraction/relaxation coupling is involved
5 in decreasing stocks of Ca^{2+} sarcoplasmic reticulum (SR) that compromises the amount of Ca^{2+}
6 released through the RyR1 channels (calcium channel located in the terminal cisterns of the
7 SR) for contraction during muscle activation. Some authors have pointed to the fact that, in
8 other diseases, the reduction in Ca^{2+} uptake by SR leads to greater accumulation of Ca^{2+} in
9 cytosol, reducing sensitivity of the contractile apparatus to Ca^{2+} , breaking mitochondrial
10 homeostasis and activating several catabolic processes, then contributing to the loss of muscle
11 mass and strength [15-17].

12 A new classification of cachexia in experimental models has been recently proposed,
13 it is the ACASCO scale (Animal CAchexia SCOrE) which makes possible to classify the
14 severity levels of the syndrome by quantifying it, evaluating cachexia experimental models in
15 separated stages [18]. In this study, we evaluated the model of cachexia induced by C26 tumor
16 to analyze the effects of cachexia in different skeletal muscle fiber types, at different
17 experimental times, as well as the involvement of biochemical, oxidative and functional
18 changes during the syndrome's progression.

19

20 **Materials and Methods**

21 **Animals and tumor inoculation**

22 Male Balb-c mice aged 5-6 weeks were randomly distributed into 15 animals/groups
23 and an experimental design was carried out to establish the period in which C26 tumor induced
24 early and late cachexia. In this step, animals were divided into 2 groups: (I) a control group,
25 that received 200 μL of saline solution (PBS) in dorsal region, s.c.; and (II) a group inoculated
26 with 1×10^5 of C26 murine colon carcinoma cells (CRC) in 200 μL of PBS and followed for 14
27 days. The parameters for cachexia classification were recorded daily. After cachexia
28 determination in the initial study, a new group of animals were divided into 4 groups: (I) control
29 7 days (Control Pre-cachexia – CPcaq); and (II) control 14 days (Control Caquexia - Ccaq),
30 both inoculated with 200 μL of PBS s.c. at dorsal region; (III) tumor 7 days (Pre-cachexia –
31 PCaq), that suffered inoculation with 1×10^5 C26 cells in 200 μL PBS s.c., at dorsal region and
32 followed by 7 days; and (IV) tumor 14 days (Caquexia – Caq), that suffered inoculation with
33 1×10^5 C26 cells [GB9] in 200 μL PBS s.c., at dorsal region and followed by 14 days. During all
34 experimental periods, mice were fed with commercial food (Nuvital[®], Nuvilab, Brazil) and water

1 *ad libitum*, besides being treated according to national resolutions. All the procedures were
2 approved by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA-UEL), under protocol no. 18592-
3 2018.87/ OF 206/2018.

4 At the last day of experiment periods, animals were anesthetized i.p. with
5 ketamine/xylazine (1:2, 100 μ L) solution and euthanized by exsanguination. Skeletal muscles
6 (tibialis anterior [TA], extensor digitorum longus [EDL], gastrocnemius [GAST] and soleus
7 [SOL]), retroperitoneal, perigonadal and brown fat (taken from interscapular region), heart and
8 300 μ L of total blood were collected. To obtain plasma, blood collected by cardiac puncture
9 was centrifuged at 600 x g for 15 minutes at 4°C. Plasma was then separated and stored at -
10 20°C, until use.

11 C26 tumor cell stocks were regularly maintained in culture medium, in a reservoir
12 containing liquid nitrogen (-190°C). Cells were grown in RPMI medium supplemented with 10%
13 fetal bovine serum (SFB), 1mM sodium pyruvate, 1% streptomycin/1% penicillin glutamine. In
14 the time of s.c. inoculation, cells were expanded, collected from the bottles, washed twice to
15 remove culture medium, counted, and diluted in PBS.

16

17 **Parameters used to evaluate cachexia:**

18 *Body and muscle weights:* animals were weighed before the beginning, and every 2 days until
19 the end of the experimental period. Weight gain was calculated by [(Final weight - Tumor
20 weight) - Initial weight] (g). In order to analyze gain of muscle mass, at the time of euthanasia,
21 TA, EDL, GAST and SOL were quickly collected and weighed separately. Brown and white fat
22 and heart were also weighed separately.

23 *Tumor Size and Weight:* tumor volume was individually measured with a digital caliper every
24 two days. Height, length and thickness were determined, and a formula (width x length x
25 thickness) used to determine an ellipsis volume was applied to obtain final results, in mm³.
26 After euthanasia, tumors were collected and weighed.

27 *Hand Grip Test:* The strength of the forelimb was evaluated through Hand Grip Test (HGT),
28 with a digital dynamometer (EEF 305 Grip StrengthMeter, Insight), that registers the peak of
29 strength the animal grips to the equipment. Only after one week of adaptation, animals were
30 exposed to the test daily, at the same time, light conditions, bar diameter and with the same
31 evaluator [19]. Mean values were calculated with the peak of each day of the test to express
32 results, in g.

1 *Food Intake:* As reduction in food intake is a signal of cachexia, feeding was monitored daily,
2 by weighing the food of each experimental group every 24h. Food intake was calculated by
3 food consumption / group / animal / day (g).

4 *Temperature:* Significant variation in body temperature is a sign of metabolic alteration, which
5 is observed in initial stages of cancer cachexia in humans [1]. Rectal temperature was
6 registered once a day, every 3 days, using a digital sensor thermometer. Measurements were
7 assayed at the same period of the day, light condition, by the same evaluator, and expressed
8 in °C.

9 *Blood glucose:* Plasma glucose levels were measured in a glucometer (Accu-Check™), using
10 10µL of plasma for each animal. Three measurements were made and then the mean values
11 were calculated and used for statistics. Results were expressed in mg/dL.

12 *Blood Lactate:* For determination of blood lactate amounts, the enzymatic method described
13 by Gutman & Wahlefeld [20] was used. Briefly, the L-lactate is oxidized to pyruvate by NAD⁺
14 in a reaction catalyzed by lactate-dehydrogenase (LDH), and NADH formation occurs. The
15 amount of NADH formed is proportional to the concentration of L-lactate and measured
16 spectrophotometrically at 340 nm.

17 *Hematocrit:* blood was withdrawn from anesthetized mice by cardiac puncture and collected in
18 heparinized tubes. A drop was used to fill hematocrit capillary tubes, which were centrifuged
19 in a hematocrit centrifuge for 5 minutes at 800 x g. Hematocrit was calculated as the volume
20 percentage of packed red cell volume in total blood.

21 *Plasma triglycerides concentration:* Triglycerides concentration in plasma were determined by
22 a colorimetric kit, according to the manufacturer's instructions (Vida Biotecnologia - BR).
23 Quantification was performed using a spectrophotometer (Shimadzu UV1650 PC, Nakagyo-
24 ku, Kyoto, Japan) at 500 nm. The results were expressed as triglycerides mg/dL of plasma.

25 *Cytokine Quantification:* IL-6 was determined in plasma by ELISA (*enzyme-linked*
26 *immunosorbent assay*) kit, according to the manufacturer's instructions (eBioscience®, USA).
27 The quantification was performed using a microplate reader (Thermo Scientific) at 450 nm.
28 Results were expressed in pg cytokine/mL of plasma.

29

30 **Muscle adaptation:**

31 *Muscle Cross Sectional Area (CSA):* To establish a histological parameter of muscle
32 adaptation, cross-sectional area of soleus (slow-twitch fibers) and EDL (fast-twitch fibers)

1 muscle fibers was quantified. For this purpose, muscle samples were collected and fixed in
2 Carnoy (3 methanol: 1 acetic acid) for 30 minutes and then embedded in paraffin. Semi-serial
3 5µm sections were then performed (5 slices/slide with an interval of 50µm/slice) for each
4 muscle sample. The sections were stained with hematoxylin and eosin. To assess the
5 measurement of the cross-sectional area, images (5 fields/slice/animal) were captured in a
6 photomicroscope (Olympus BX43) at 200x magnification. An image analysis system
7 (ImagePro-Plus 4.0, Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA) was used to determine the
8 fiber area in square micrometers (µm²), totaling the measurement of approximately 600
9 fibers/animal [21]. Data was expressed using a frequency distribution histogram in number of
10 occurrences. From the histogram, a Gaussian distribution curve was extracted and compared
11 statistically

12

13 *Muscle proteolytic activity:* Chymotrypsin-like proteolytic activity was quantified using a
14 Proteasome Glo™ Chymotrypsin-like Cell Based Assay kit (Promega, Madison, WI, USA). For
15 the assay, 25 mg muscle powder was added to 1 ml 10 mM KH₂PO₄, pH 7.4, in 0.9% NaCl
16 and gently homogenized. Fifty microliters of the resulting muscle homogenate was pipetted in
17 duplicate on to 96-well microplates, and the final reagent mixture with luminescent substrate
18 was added to the medium. After 5 min, under light protection, the luminescent signal at the
19 plate was detected with a Glo-Runner microplate reader luminometer (Turner Designs), and
20 the results were expressed as RLU per milligram of total protein [21].

21

22 *Plasma Creatine-kinase:* total CK concentration in plasma was determined by a colorimetric
23 kit, according to the manufacturer's instructions (Gold Analisa - BR). Quantification was
24 performed using a spectrophotometer (Shimadzu UV1650 PC, Nakagyo-ku, Kyoto, Japan) at
25 340 nm. The results were expressed as CK U/L of plasma.

26

27 *Western Blotting:* Soleus muscle of tumor bearing animals and healthy animals were
28 homogenized in lysis buffer containing 0.1 M TRIS-HCl (pH 7.2), 0.2% SDS, 0.1% sodium
29 deoxycholate, and 0.3M NaCl, and centrifuged for 15 min at 900xg at RT. Total protein
30 quantification was performed by using the Bradford method. 20 µg of total protein were
31 separated in 12% sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)
32 and transferred to a nitrocellulose membrane. Membranes were probed using primary
33 antibodies against SERCA (sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase - (mouse
34 monoclonal, dilution 1:5000; Thermo Fischer Scientific, MA, USA) and against GAPDH (mouse
35 monoclonal, dilution 1:10000; Thermo Fischer Scientific, MA, USA), diluted in 10% nonfat dry
36 milk in TBS-T overnight at 4°C. Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-mouse (dilution
37 1:10000, Merck Millipore, Darmstadt, Germany) was used as secondary antibody. Peroxidase

1 activity was detected using an Enhanced Chemiluminescence (ECL) kit (Perkin Elmer,
2 Waltham, MA). The bands were visualized using a gel documentation system (UVItec,
3 Cambridge, UK), and the band densitometric quantification of signals was performed using
4 Image J software (National Institute of Health, Bethesda, MA). The values obtained were
5 averaged and normalized to those of GAPDH used as a loading control.

6
7 *Plasma calcium concentration:* Calcium concentration in plasma was determined by the
8 colorimetric kit Calcium Arsenazo, according to the manufacturer's instructions (Doles - BR).
9 Quantification was performed using a spectrophotometer (Shimadzu UV1650 PC, Nakagyo-
10 ku, Kyoto, Japan) at 670 nm. The results were expressed as calcium mg/dL of plasma.

11

12 **Fatigability and function:**

13 *Mobility in the cage:* Mobility was assessed and adapted according to the criteria established
14 by Chumbinho et al. 2016 [22]. Animals were filmed for 30 minutes, and the following actions
15 were quantified: (a) exploration of the environment (EE); (b) looking for food (LF); and (c) self-
16 cleaning (SC). The mice were evaluated on day -1 (d-1 precedes tumor inoculation), on day 6
17 (d6 - precedes euthanasia of Pcaq group) and on day 13 (d13 - precedes euthanasia of Caq
18 group) and compared to their respective controls. Qualitative behavioral analysis to assess the
19 main activities performed by the mice were expressed in percentage. Analyzes were
20 performed by a single trained person.

21 *Forced Swimming Test:* The forced swimming test is a behavioral test in rats or mice,
22 commonly used to assess the degree of strength and behavioral inhibition. The test was carried
23 out following the protocol proposed by Suman et al. (2016), in which immobility, escalation and
24 latency were evaluated [23]. The animals were evaluated following the same protocol of days
25 for the evaluation of mobility in the cage. For the analysis of results, the parameters were
26 quantified by their duration. Analyzes were performed by a single trained person.

27 *Discomfort symptoms:* The following symptoms were monitored: (a) piloerection, (b) diarrhea
28 or constipation [pellet output], (c) hunched posture, (d) tremors, (e) closed eyes and (f) red
29 tears (chromodacryorrhea). Points to establish the score of discomfort symptoms were: 0-2
30 symptoms: 0 points; 3-6 symptoms: 0.5 points; 4-6 symptoms: 1 point [18].

31 *Intruder-resident paradigm:* This paradigm is based on the establishment of a territory by a
32 male and its defense against unfamiliar male intruders. It consists of introducing a male, the
33 intruder, into the home cage of another male, the resident, with the former being defeated by

1 the latter. In the cachexia mouse model, the interaction time between the intruder and the
2 resident was measured during a 2-minute interval. Resident-intruder interaction was evaluated
3 based on rating the level of interest of the resident in the intruder: very interested, 0; interested,
4 1; little interest, 2; no interest, 4 [18].

5 *ACASCO*: ACASCO is the Animal CAchexia SCORe proposed by Betancourt et al. 2019 [18],
6 that takes in consideration the following components of scoring: (a) body and muscle weight
7 loss, (b) inflammation and metabolic disturbances, (c) physical performance, (d) anorexia, and
8 (e) quality of life measured using discomfort symptoms and behavioral tests. These five factors
9 allow not only qualitative but also quantitative classification of this syndrome, and that different
10 stages of cachexia have different scores, which allows us to classify cachexia adequately and
11 comprehensively in severity levels [18].

12

13 **Muscle Oxidative Stress:**

14 *Carbonyl Proteins*: Carbonyl protein content was measured by ELISA method as described by
15 Alamdari et al. 2005 [24], using the muscles SOL and EDL. The method consists in use of
16 bovine serum albumin (BSA) oxidized as a standard and a small amount of sample (5µg of
17 protein). The absorbance was corrected by total protein and results are expressed in nmol/mg
18 of protein.

19 *Determination of TBARS*: Lipid peroxidation of muscle homogenates of all groups was
20 determined by TBARS reaction. MDA (malondialdehyde) formed during peroxidation reacts
21 with TBA (thiobarbituric acid) to generate a colored product, a (TBA)₂-MDA adduct. In acid
22 solution, (TBA)₂-MDA absorbs light at 532 nm and is readily extractable into organic solvent
23 such as butan-1-ol. GAST (mixed fast- and slow-twitch fibers, 20mg/mL) muscle was used in
24 the assay. It was determined according to Guarnier et al. (2010) [10], in a spectrophotometer
25 (Shimadzu UV1650 PC, Nakagyo-ku, Kyoto, Japan) at 535nm and 572nm and the results were
26 expressed in nmol/20mg tissue.

27 *Glutathione Assay*: Determination of total glutathione (GT) was performed by the recycling
28 method, as described by Tietze (1969) [25]. We used homogenates concentration of 50mg/mL
29 of GAST muscle. Absorbance was detected at 412nm, and results were expressed in µL of
30 GT/mg protein.

31 *Chemiluminescence stimulated by Tert-Butyl hydroperoxide*: Reaction mixtures were placed
32 in 2-ml luminescence tubes containing the following: total muscle homogenate from GAST
33 muscle (15mg/mL); 10 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄ buffer (with 120mM KCl, pH 7.4); and 3 mM tert-
34 butyl hydroperoxide, in a final volume of 1 mL. The tert-butyl hydroperoxide-initiated

1 chemiluminescence (CL) reaction was assessed by a luminometer (TD/20 20; Turner Designs)
2 with a response range of 300–650 nm. The tubes were kept in the dark until the moment of
3 assay, which was carried out at a room temperature of 30°C. For each animal was performed
4 a 30 min curve, where each point represented the differential smoothing of 300 readings,
5 obtained by interpolation. The results were expressed in relative light units per gram of tissue
6 (RLU/g tissue) [26, 27].

7

8 **Protein Concentration:**

9 Total protein content was determined by the method described by Lowry (1951) [28], modified
10 by Miller (1959) [29], where absorbance at 660 nm was used for each sample to determine
11 total protein content. Both methods used BSA as standard.

12

13 **Statistical Analysis**

14 All data were firstly submitted to the Shapiro-Wilk normality test. After considered parametric,
15 results were expressed as mean \pm SEM. For parametric tests, we used unpaired t Student's
16 test for selected comparisons. Statistical significance was considered when $P < 0.05$.
17 Percentage descriptions were only presented, evaluated, and compared as pie charts. t-butyl-
18 initiated chemiluminescence curves and Gaussian curves extracted from histograms were
19 evaluated by two-way ANOVA, followed by Tukey's post hoc test.

20

21 **Results**

22 ***Understanding tumor development and C26-induced cachexia***

23 Figure 1 demonstrates basically the 4 main parameters used to detect and classify
24 cachexia: body weight, food intake, sarcopenia, and temperature. Tumor-bearing mice (CRC)
25 showed decreased body weight when compared to control group starting from the 4th day after
26 tumor inoculation. While the control group continued to gain body weight over time, CRC
27 stopped gaining and then, to lose weight progressively (Figure 1A). When we evaluated final
28 body weight gain, CRC group showed significant decrease (-5 ± 0.74 g) when compared to
29 Control ($+3 \pm 2.85$ g, $p < 0.05$) (Figure 1B). In addition, food consumption registered daily and
30 individually revealed no difference between both groups (Figure 1C), but when the total amount

1 of food consumed for 14 days was assayed, CRC showed to consume 17.5% less chow than
2 controls (from 54.8 ± 0.19 g to 66.43 ± 0.78 g, respectively, $p < 0.05$) (Figure 1D). Sarcopenia
3 is a concept that mandatorily involves strength loss, and when our hand grip test was
4 performed sequentially until day 14, it was observed that strength started to decrease already
5 on day 4 after tumor inoculation, continuing to decrease progressively until 14th day (Figure
6 1E). When delta strength (final-initial) was calculated, CRC showed -10 ± 1.2 g when compared
7 to $+0.27 \pm 0.17$ g in the control group ($p < 0.05$, Figure 1F). There was no significant differences
8 in body temperature between groups (Figures 1G and 1H).

9 Together, these results allowed us to classify late cachexia 14 days after tumor
10 inoculation, while early stage (pre-cachexia) could be established between 4th and 7th day (less
11 than 2% of total body weight loss, no gross difference in food intake, and light differences in
12 hand grip test). Then, in the present study, we decided to use 7th day as Pre-cachexia stage
13 (Pcaq) and 14th day as cachexia stage (Caq).

14 ***Cachexia parameters and comparison of qualitative muscle mass loss between Pre-*** 15 ***cachexia and Cachexia:***

16 After determining cachexia, new groups were divided into pre-cachexia at 7 days
17 (Pcaq) and cachexia at 14 days (Caq) after C26 inoculation, accompanied in parallel by their
18 respective control groups (CPcaq and CCaq). Both Pcaq and Caq groups showed significant
19 weight loss ($p < 0.05$). Pcaq resulted in $+0.21 \pm 0.03$ g when compared to $+0.67 \pm 0.21$ g in
20 CPcaq (no body weight loss, Figure 2A). Caq demonstrated -1.7 ± 0.17 g when compared to
21 0.25 ± 0.12 g on CCaq (Figure 2B). When evaluating daily food consumption/animal (Figures
22 2C and 2D), only Caq group showed significant decrease (3.9 ± 0.37 g, respectively),
23 compared to CCaq groups (6.56 ± 0.069 g, respectively). Interestingly, metabolic parameters
24 showed significant decrease in temperature of Caq group when compared with CCaq group
25 (0.2800 ± 0.3803 and 1.445 ± 0.3166 °C, respectively) (Figure 2E) in addition to significant
26 reduction in blood glucose levels in both Pcaq (156.5 ± 11 mg / dL, $p < 0.05$) and Caq groups
27 (74.00 ± 4.53 mg / dL, $p < 0.05$), in relation to their respective controls (222.0 ± 11.64 and 170.0
28 ± 4.71 mg / dL) (Figure 2F). Lactate presented no significant differences in the Pcaq and CPcaq
29 comparison (6.52 ± 0.94 and 6.73 ± 0.71 , respectively), but the group Caq (9.623 ± 2.81
30 mM/mL) showed an elevation e when compared with the group Ccaq (5.8 ± 0.54 mM/mL;
31 $p < 0.05$) (Figure 2G).

32 Figure 3 shows qualitative differences in muscle mass loss during C26-induced
33 cachexia. The CSA fiber frequency distribution differed significantly between groups. In the
34 histograms, it is possible to observe that Pcaq and Caq groups presented curves sprained to

1 the left, indicating muscle atrophy in relation to their respective control groups, in different time-
 2 points when SOL and EDL were compared. Interestingly, At SOL (Figure 3A), histogram curves
 3 revealed significant sprain to the left in both CPcaq x Pcaq and CCaq x Caq comparisons,
 4 which included also significant differences in the comparison Pcaq x Caq ($p < 0.001$ for all
 5 comparisosc). CPcaq group showed median area of $13.06 \pm 2.662 \mu\text{m}^2$, Pcaq of 10.19 ± 2.606
 6 μm^2 , CCaq median of $12.8 \pm 2.684 \mu\text{m}^2$ and Caq showed median area of $9.872 \pm 2.49 \mu\text{m}^2$.
 7 At EDL (Figure 3B), the histogram curves analysis revealed significant differences only at late
 8 cachexia stage (Caq group, $p < 0.001$) when compared to control. In addition, CPcaq group
 9 showed median area of $16.65 \pm 2.745 \mu\text{m}^2$, Pcaq of $16.55 \pm 2.921 \mu\text{m}^2$, CCaq median of 13.72
 10 $\pm 2.99 \mu\text{m}^2$, and Caq showed median area of $8.755 \pm 1.984 \mu\text{m}^2$.

11 Besides skeletal muscle modifications, heart weight presented no significant
 12 differences (Figure 4A, $p < 0.05$). Regarding adipose tissue, no significant differences were
 13 observed in brown adipose tissue in comparison to their respective controls, neither in PCaq
 14 or in Caq (Figure 4B). However, in white adipose tissue, although means were different in
 15 PCaq in comparison to CPcaq, no statistical variation was found ($p > 0.05$) while the comparison
 16 between Caq and CCaq showed mean reduction of 70% (Figure 4C). Plasma triglycerides
 17 concentration presented significant reduction in the comparison between CPcaq ($200.8 \pm$
 18 3.207 mg / dL) and Pcaq groups ($180 \pm 2.51 \text{ mg / dL}$). Caq group also revealed significant
 19 decrease in levels of plasma triglycerides when compared to CCaq (156 ± 5.32 and 190 ± 2.04
 20 mg / dL) (Figure 4D), indicating a possible mechanism of lipolysis, that initiates at early stages
 21 of the syndrome.

22 ***When function is impaired in C26-induced cachexia***

23 *Forced Swimming Test:* Forced swimming test evaluates, by means of its different parameters,
 24 general resistance, and strength conditions. Both can be related to specific fiber types. Figure
 25 5 (A-F) shows time of swimming, climbing and immobility assayed in the same periods of time
 26 in CPcaq, PCaq, CCaq and Caq groups just before and after tumor inoculation. Although no
 27 difference could be observed in Swimming time (Figure 5A), Pcaq group showed significant
 28 increase in climbing activity at d6, when compared to d-1 (98 ± 3.85 and $52 \pm 6.3 \text{ s}$,
 29 respectively, $p < 0.05$) (Figure 5B). In immobility time, that is correlated with fatigability, there
 30 was no significant difference between the two groups (Figure 5C). When the same parameters
 31 were assayed in Caq group, no significant differences were found in swimming and climbing
 32 times (Figures 5D and 5E), but immobility showed to be significantly increased in d13 in relation
 33 to d-1 (91 ± 9.7 and $62 \pm 4.1 \text{ s}$, respectively, $p < 0.05$) (Figure 5F).

1 *Mobility in the cage:* Mobility in mice is a parameter that can be extrapolated as quality of life
2 in humans, being correlated with fatigue and asthenia symptoms. Figures 5G-J show the
3 results of mobility in PCaq, and Caq in d-1 and d6 or 13, respectively, expressed as a
4 percentage of 30 min test. The Pcaq group, there was a switch between EE (decreasing from
5 59.70% to 48.28%) and LF (increasing from 37.31% to 48.28%). No change was observed in
6 time of SC (Figures 5G and 5H). On the other hand, Caq group showed the opposite switch
7 between EE (increasing from 48.57% to 61.22%) and LF (decreasing from 40% to 22.45%).
8 Finally, SC revealed a slight increase in activity in d13 compared to d-1 (16.33% and 11.43%,
9 respectively) (Figures 6I and 6J).

10 *ACASCO:* ACASCO is a cachexia rating scale that considers numerous parameters of
11 cachexia development all together, as described in table 1. Body weight loss is the main
12 responsible of ACASCO, with a score of 40% of the total score, followed by the corresponding
13 inflammation (22%). It is possible to observe that PCaq group showed a score of 41 points out
14 of 92 possible points, while Caq group showed 61 points out of 92 possible, suggesting that
15 the severity of cachexia tends to worsen over time, and that our previous classification was
16 determined adequately. The results that represent differences observed between the mean
17 values of the different groups and ACASCO parameters are found in table 2.

18 *Carbonyl protein:* The levels of carbonyl proteins are correlated with some types of muscle
19 atrophy. The results shown in Figure 6 demonstrates that, at SOL, the content of carbonylated
20 proteins in Pcaq was not different in comparison with CPcaq (480.5 ± 3.928 nmol/mg of protein;
21 483.3 ± 7.451 nmol/mg of protein, respectively), while Caq group showed significantly
22 difference in comparison with its control group ($530.9 \pm 6,642$ nmol/mg of protein; $482.2 \pm$
23 8.041 nmol/mg of protein, $p < 0.05$) (Figure 6A). On the other hand, EDL muscle showed
24 significant differences already in Pcaq when compared to its control ($455.5 \pm 7,725$ nmol/mg
25 protein; $434.6 \pm 1,624$ nmol /mg protein, respectively, $p < 0.05$). Caq and CCaq demonstrated
26 no significant differences (458.5 ± 8.541 nmol/mg of protein; 515.0 ± 9.87 nmol/mg of protein,
27 respectively) (Figure 6B). It seems that in EDL, protein oxidation precedes atrophy, while in
28 SOL, it does not.

29 *TBARS:* MDA, an end-product of oxidative damage to lipids, was quantified by TBARS
30 colorimetric method, performed in GAST muscle. Thus, MDA in the Pcaq and CPcaq group
31 were not significantly different (47.92 ± 4.54 and 43.38 ± 4.47 nmol/20 mg of tissue). However,
32 Caq group demonstrated significant increase in the levels of MDA when compared to CCaq
33 (51.56 ± 9.16 and 42.4 ± 2.23 nmol/20 mg of tissue) (Figure 6C).

1 *GSH*: Total glutathione is usually used to estimate cytosolic water-soluble antioxidant capacity.
2 The concentration of GSH in GAST muscle was statistically different in Pcaq ($0.2617 \pm$
3 $0.008758 \mu\text{L}/\text{mg}$ protein) in comparison to CPcaq ($0.3361 \pm 0.009478 \mu\text{L}/\text{mg}$ protein, $p < 0.05$).
4 Caq and CCaq groups did not differ significantly (0.3084 ± 0.01602 and $0.3333 \pm 0.01290 \mu\text{L}$
5 $/\text{mg}$ of protein, respectively) (Figure 6D).

6 *Analysis of chymotrypsin-like proteolytic activity*: Chymotrypsin-like proteolytic activity did not
7 differ between the Pcaq and CPcaq groups (138.2 ± 21 and 146.7 ± 49.35 RLU/mg tissue,
8 respectively). In contrast, Caq group revealed significantly higher chymotrypsin-like proteolytic
9 activity in comparison to its control group (212.5 ± 26.31 and 127.8 ± 16.5 RLU/mg
10 tissue) (Figure 6E). Interestingly, these results were coincident with the ones related to protein
11 oxidation.

12 *Chemiluminescence stimulated by butyl-hydroperoxide (CL)*: The measurement of lipid
13 hydroperoxides by CL is a very sensitive method to evaluate oxidatively pre-modified
14 membrane lipids. In GAST muscle, both Pcaq and Caq groups showed significantly increased
15 CL curves over time when compared with their respective control groups ($p < 0.001$ in both
16 analyses). This means that the phenomenon of oxidative modification in muscle membranes
17 is present in muscle already at early stages of C26-induced cachexia (Figures 6G and 6H).

18 *Plasma CK concentration*: The protein creatine kinase (CK) is present in cardiac muscle,
19 skeletal muscle, and the brain. Any damage to the cells of these organs, mainly in their
20 membranes, can cause increase in serum/plasma total creatine kinase. Levels of CK showed
21 significant increase in the levels of CK protein in Pcaq when compared to CPcaq (1196 ± 32.8
22 and 961.3 ± 50.10 , respectively, $p < 0.05$). Curiously, in Caq, decreased levels were observed
23 in relation to its control (995.7 ± 21.9 and 1094 ± 19.5 , respectively, $p < 0.05$) (Figure 6F).

24 ***Parameters that complement findings and address possible mechanisms:***

25 *Plasma Calcium Concentration*: As previously mentioned, excessive calcium leak from both
26 SR and sarcoplasm can lead to increased systemic levels of free Ca^{2+} . No significant changes
27 were observed between CPcaq and Pcaq groups (10.66 ± 0.2 and 10.62 ± 0.31 mg/dL,
28 respectively). On the other hand, Caq group revealed significant increase in levels of plasma
29 calcium when compared to CCaq (13.10 ± 0.21 and 11.42 ± 0.2 mg / dL, respectively; $p < 0.05$)
30 (Figure 7A).

31 *SERCA assayed by Western Blotting*: Not surprisingly, SERCA1, a protein involved on muscle
32 energy metabolism, cytosolic Ca^{2+} control, and that is incrustrated at SR membrane, showed

1 to be 2.2x increased in SOL Caq in comparison to SOL CCAq ($p < 0.05$). No differences were
2 found in SERCA 1 when CPCaq and PCaq were compared (Figure 7B).

3

4 **DISCUSSION**

5 Cachexia, an adverse cancer effect, directly influences the prognosis and quality of life
6 of patients. It is diagnosed in 2.4% of cases, and among these, only 6.4% receive treatment,
7 which makes it a neglected syndrome [1]. In recent years, several experimental models have
8 been used in studies of cachexia, and each tumor phenotype responds in a different way. In
9 the present work we seek to elucidate how cachexia evolves over time in a model of C26
10 murine colon carcinoma, a reliable model, capable of meeting parameters for cachexia
11 classification, in addition to the possibility of evaluating the influence of oxidative stress and its
12 effects, and consequently, muscular contractile apparatus, and affection to physical
13 performance in animals.

14 Decreased food intake is one of the first signs seen in cachexia and is directly related
15 to weight loss [30]. Ballarò et al. (2019) [31] using higher concentration of cells (same lineage
16 that we use) compared to our study, showed reduced body weight and food intake 14 days
17 after tumor inoculation, which is in accordance with the results of this work. In humans, breast
18 cancer patients show marked decrease in muscle strength before and after anticancer
19 treatment, and gastrointestinal cancer patients show around 60% of reduction in handgrip
20 strength, which is one of the most applied tests in clinical practice [32-33]. In an experimental
21 model of colorectal carcinoma HCT116 of human cells, animals in the tumor group showed
22 loss of strength of approximately 20% compared to their controls. Similar findings were found
23 in a study with Lewis carcinoma, where animals showed reduction in muscle strength 4 weeks
24 after Lewis tumor inoculation [34-35]. Our results are consistent with these findings, showing
25 reduction in muscle strength in the cachexia stage through HGT, while in the condition of pre-
26 cachexia there are no changes. These data reinforce the fact that, in this condition, there is
27 great heterogeneity in the classification parameters.

28 Foladiun et al. 2017 [36] found that the quality of life and spontaneous physical activity
29 of cancer patients were significantly reduced during one week of evaluation, and that isolated
30 spontaneous physical activity decreased over time during the follow-up of cancer patients. The
31 forced swimming test (FST) is a rodent behavioral test used to evaluate antidepressant drugs
32 and experimental manipulations. It is simple to drive, requires a minimum of equipment, it is
33 fast and inexpensive [18,37]. Here, we investigate the immobility, climbing and swimming
34 behaviors [17]. We observed significant increase in immobility in the animals in the cachexia

1 group, which points to a reduction in physical function and increased fatigability in these
2 animals, confirming the muscle weakness accompanied by physical decline, which happens
3 in cachexia over time.

4 Apparently, loss of muscle mass in cachectic individuals comes in great part from
5 glycolytic fibers (EDL) that have the most extensive SR and large amounts of glycolytic
6 enzymes, whereas oxidative fibers (SOL) have superior antioxidant defenses and have greater
7 mitochondrial volume when compared to glycolytic fibers, which could be a defense
8 mechanism against cancer cachexia [38]. Brown et al. (2017) [39], using a lung cancer model,
9 showed that the weight of the tibialis anterior, gastrocnemius, plantaris, quadriceps and soleus
10 muscles were significantly lower 4 weeks after tumor inoculation compared to the control. Pin
11 et al. (2015) [40] showed loss of mass of the gastrocnemius and tibialis anterior muscles in
12 animals with murine colonic carcinoma. Our results bring a different profile, showing that the
13 predominant loss of muscle mass seems to be different in different cachexia stages: glycolytic
14 fibers are compromised in late stage, while oxidative fibers are affected since the early
15 cachexia development. These data are not in accordance with findings generally related to
16 cachexia, reinforcing the idea that muscles with different metabolisms behave differently in
17 different times and experimental models.

18 Oxidative stress, when produced over long periods, can activate the proteasomal
19 system and cause the oxidation of proteins, which are involved with the mechanisms of muscle
20 mass loss in cancer cachexia [5]. In the study conducted by Guarnier et al. (2010) [5] using
21 Walker-256 solid tumor inoculated in rats, the levels of hydroperoxides in gastrocnemius
22 muscle had an evident increase at the fifth day in animals with tumor. Here we showed that
23 lipid peroxidation in the gastrocnemius muscle is evidently greater already at seventh day after
24 tumor inoculation when compared to the control group, suggesting that lipid peroxidation may
25 be an initial event in cancer cachexia, even previously to the famous activation of UPS by
26 oxidatively modified proteins. Considering this, protein carbonylation, a process in which
27 oxidative stress irreversibly damaged proteins and leads to protein degradation, was increased
28 in the EDL muscle in pre-cachexia stage, whereas in the SOL muscle the carbonylated proteins
29 were increased in cachexia stage. These data pointing out that cancer cachexia can alter the
30 redox balance in muscle fibers, inducing oxidative modifications of proteins involved in muscle
31 structure and function and inducing atrophy by distinct ways. However, CL results showed that
32 even in SOL, membranes are already oxidatively modified at 7th day. Our findings agree with
33 those found by Marin-Corral et al. (2010) [41] in which the level of protein carbonylation was
34 higher in the soleus muscle in rats with Yoshida AH-130 hepatoma when compared to their

1 controls, and those of Barreiro et al. (2005) [42], where carbonylated proteins were increased
2 in gastrocnemius muscle. In both studies, no differences related to time-points were indicated.

3 The soleus muscle is an active postural muscle during standing and walking [43], and
4 it has a more extensive mitochondrial volume. Here, we showed an increase in mass loss and
5 protein carbonylation, accompanied by increase in immobility in FST in the cachexia group,
6 which may suggest mitochondrial impairment, with increased ROS production, increased
7 fatigue and weakness of this muscle due to cachexia, playing a significant role in the decline
8 of physical function. Besides, calcium ions have an interesting function in the loss of muscle
9 mass. The reduced SERCA activity is involved in decreasing the stocks of Ca^{2+} in the SR,
10 increasing the level of Ca^{2+} ions in the cytosol, and being able to activate catabolic processes
11 involved in the process of loss of muscle mass and strength [12-13]. Ca^{2+} imbalance may be
12 responsible for muscle atrophy, as demonstrated by Wu et al. (2012) [44], who reported 330%
13 of increasing in intracellular concentrations of Ca^{2+} at rest in the soleus muscle of rats after 14
14 days of hindlimb suspension.

15 In our study, we found an increase in plasma calcium concentration in the Caq group,
16 which coincides with the findings in the increase in SERCA amounts in the SOL muscle in Caq,
17 corroborating the findings by Fontes-Oliveira et al. (2015) [45], in which there was an increase
18 in SERCA 1 activity, in animals with Yoshida AH-130 tumor, indicating a dysregulation in the
19 SERCA / ATPase pump, inducing processes involved in the loss of muscle mass and strength.

20 Animal CAchexia SCORe or ACASCO is a scoring method to classify the degree of
21 severity of cachexia in experimental animal models, it is derived from CASCO, a classification
22 method used in humans [19, 46]. ACASCO considers the loss of body weight and muscle
23 mass, inflammation and metabolic disorders, physical performance, anorexia, and quality of
24 life. According to the results of our score, the symptoms that scored the most were weight loss,
25 anorexia, and inflammation, which makes these criteria important in the classification of
26 cachexia. To punctuate the topic of inflammation, we used IL-6 plasmatic as a parameter. IL-
27 6 levels were increased in the pre-cachexia group, which is in line with our findings in increased
28 muscle mass loss, increased in hydroperoxide levels, and decreased GSH levels in the GAST
29 muscle, which may indicate an increase in the inflammatory response in favor of the reduction
30 of antioxidant defenses in this period. Glucose levels were reduced in both groups with tumor,
31 a result that coincides with the decrease in food intake in the cachexia group. Glucose is the
32 main substrate used by the brain, this hypoglycemia makes us raise the hypothesis of a
33 disturbance in the neuronal pathways that would trigger changes in appetite, and consequently
34 induce weight loss. Our work demonstrates through ACASCO that the cachexia group had a
35 higher score compared to the pre-cachexia group, thus suggesting that the degree of cachexia

1 severity worsens over time. This classification method becomes a useful tool in the
2 classification of cachexia, allowing to monitor the changes that happen to the animal over time,
3 which allows early intervention.

4 **CONCLUSION**

5 In the present study, we show an experimental model of cachexia that is reliable and capable
6 of meeting important parameters for the classification of cachexia, in addition to being able to
7 assess differences in the loss of quality of skeletal muscle over time. In summary, our findings
8 indicate that, in the model used here, oxidative fibers seem to be compromised in cachexia,
9 which may indicate a mitochondrial compromise that leads to the production of ROS and the
10 oxidation of muscle contractile proteins, with consequent loss of muscle mass and reduced
11 physical function.
12

1 **References**

- 2
- 3 1 Consenso Brasileiro de Caquexia e Anorexia em cuidados paliativos. **Revista Brasileira de**
4 **Cuidados Paliativos**, 2011, 3: 1-42.
- 5 2 FEARON K, STRASSER F, ANKER SD, BOSAEUS I, BRUERA E, FAINSINGER RL, JATOI
6 A, et al. Definition and classification of cancer cachexia: an international consensus. **Lancet**
7 **Oncology**, 2011, 12: 489–95.
- 8 3 REID MB & LI YP. Cytokines and oxidative signalling in skeletal muscle. **Acta Physiologica**
9 **Scandinavica**, 2001,171: 225-232.
- 10 4 BROWN JL, ROSA-CALDWELL ME, LEE DE, BLACKWELL TA, BROWN LA, PERRY RA,
11 et al. Mitochondrial degeneration precedes the development of muscle atrophy in progression
12 of cancer cachexia in tumour-bearing mice. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**,
13 2017, 8: 926–938.
- 14 5 GUARNIER FA, CECCHINI AL, SUZUKAWA AA, MARAGNO ALCG, SIMÃO ANC, GOMES
15 MD, et al. Time course of skeletal muscle loss and Oxidative Stress in rats with Walker 256
16 solid tumor. **MUSCLE & NERVE**, 2010, 42: 950–958.
- 17 6 DOLLY A, DUMAS J-F & SERVAIS S. Cancer cachexia and skeletal muscle atrophy in
18 clinical studies: what do we really know? **J Cachexia Sarcopenia Muscle**, 2020, 11: 1413-
19 1428.
- 20
21 7 BLEGNISKI FP, VIEIRA NA, YAMAGUCHI EY, SIGNORI L, BORDINI HP, PECORAI C, et
22 al. Sarcoplasmic reticulum volume loss participation on fiber-specific skeletal muscle waste in
23 precachexia induced by Walker-256 Carcinosarcoma. **Annals of the III International**
24 **Symposium of Experimental Pathology**. ISBN: 978-85-302-0047-3, 2019.
- 25
- 26 8 BARACOS, VE, Martin L, KORC M, Guttridge DC, Fearon K. Cancer-associated cachexia.
27 **Nature Reviews|Disease Primers**, 2018, 4: 1-18.
- 28 9 PORPORATO PE. Understanding cachexia as a cancer metabolism syndrome.
29 **Oncogenesis**, 2016, 5: 1-10.
- 30 10 FEARON KCH & MOSES AGW. Cancer cachexia. **International Journal of Cardiology**,
31 2002, 85: 73–81.
- 32 11 VANDERVENN BN, FIX DK, CARSON JA. Disrupted Skeletal Muscle Mitochondrial
33 Dynamics, Mitophagy, and Biogenesis during Cancer Cachexia a Role for inflammation.
34 **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2017, 1: 1-14.
- 35 12 ARGILES JM, MOORE-CARRASCO R, BUSQUETS S, LÓPEZ-SORIANO FJ. Catabolic
36 mediators as targets for câncer cachexia. **Therapeutic Focus**, 2003, 8: 838-844.
- 37 13 KASPRZAK A. The Role of Tumor Microenvironment Cells in Colorectal Cancer (CRC)
38 Cachexia. **Internacional Journal of Molecular Sciences**, 2021, 22: 1-34.

- 1 14 PUIG-VILANOVA E, RODRIGUEZ DA, LLORETA J, AUSIN P, PASCUAL-GUARDIA S,
2 BROQUETAS J, et al. Oxidative stress, redox signaling pathways, and autophagy in cachectic
3 muscles of male patients with advanced COPD and lung cancer. **Free radical biology &**
4 **Medicine**, 2015, 79: 91-108.
- 5 15 PIETRANGELO L, MICHELUCCI A, AMBROGINI P, SARTINI S, GUARNIER FA,
6 FUSELLA A, et al. Muscle activity prevents the uncoupling of mitochondria from Ca²⁺ Release
7 Units induced by ageing and disuse. **Arch Biochem Biophys**, 2019, 15: 22-33.
- 8 16 QAISAR R, PHARAOH G, BHASKARAN S, XU H, RANJIT R, BIAN J, et al. Restoration of
9 Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺ ATPase (SERCA) Activity Prevents Age-Related Muscle
10 Atrophy and Weakness in Mice. **Int. J. Mol. Sci.**, 2021, 22: 1-13.
- 11 17 COSTELLI P, TULLIO RD, BACCINO FM, MELLONI E. Activation of Ca²⁺-dependent
12 proteolysis in skeletal muscle and heart in cancer cachexia. **British Journal of Cancer**, 2001,
13 84:946–950.
- 14 18 BETANCOURT A, BUSQUETS S, PONCE M, TOLEDO M, GUÀRDIA-OLMOS J, PERÓ-
15 CEBOLLERO M, et al. The animal cachexia score (ACASCO). **Animal Model Exp Med**, 2019
16 2: 201-209.
- 17 19 MANDILLO S, TUCCI V, HOLTER SM, MEZIANE H, BANCHAABOUCI MA, KALLNIK
18 M, et al. Reliability, robustness, and reproducibility in mouse behavioral phenotyping: a
19 cross-laboratory study. **Physiological Genomics**, 2008, 34:243–255.
- 20 20 GUTMANN I & WAHLEFELD AW. In **Methods of Enzymatic Analysis**, (Bergmeyer, H.U.,
21 Ed,) Academic Press Inc., New York, NY, 1974, 3: 1464-1468.
- 22 21 BRUNQUELL CR, VIEIRA NA, SÁBIO LR, SCZEPANSKI F, CECCHINI AL, CECCHINI R,
23 et al. Oxidative and proteolysis-related parameters of skeletal muscle from hamsters with
24 experimental pulmonary emphysema: a comparison between papain and elastase induction
25 **Int J Exp Pathol**, 2015, 96: 140-50.
- 26 22 CHUMBINHO LC, SILVA LCP, PIZZINI CC, BATISTA WS, OLIVEIRA FS, OLIVEIRA GM.
27 Etograma de camundongos em biotério: Quais são as principais atividades destes animais
28 dentro da gaiola? **RESBCAL**, 2012, 1: 255-262.
- 29 23 SUMAN P R. Padronização Do Nado Forçado Repetido Em Camundongos Suíços Machos.
30 Tese de Doutorado, 2016. UFSC -SC, Brasil.
- 31 24 ALAMDARI DH, KOSTIDOU E, PALETAS K, SARIGIANNI M, KONSTAS AGP,
32 KARAPIPERIDOU A, et al. High sensitivity enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)
33 method for measuring protein carbonyl in samples with low amounts of protein. **Free Radical**
34 **Bio Med.**, 2005, 39:1362 – 1367.
- 35 25 TIETZE F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total
36 and oxidized glutathione: Applications to mammalian blood and other tissues. **Anal Biochem.**
37 **1969**, 27:502-522.
- 38 26 OLIVEIRA FJA & Cecchini R. Oxidative stress of liver in hamsters infected with Leishmania
39 (L.) chagasi. **J Parasitol.** 2000, 86:1067–1072.

- 1 27 FLECHA B, LLESU S, BOVERIS A. Hydroperoxide initiated chemiluminescence: an assay
2 for oxidative stress in biopsies of heart, liver and muscle. **Free Radical Bio Med.**, 1991, 10:93–
3 100.
- 4 28 LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ. Protein measurement with the
5 folin phenol reagent. **J Biol Chem.** 1951, 193:265–275.
- 6 29 MILLER GL. Protein determination for larger numbers of samples. **Anal Chem.** 1959,
7 31:964.
- 8 30 SILVA SP, SANTOS JMO, COSTA e SILVA MP, COSTA RMG, MEDEIROS R. Cancer
9 cachexia and its pathophysiology: links with sarcopenia, anorexia and asthenia. **Journal of**
10 **Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, 2020, 11: 619-635.
- 11 31 BALLARÒ R, BELTRÀ M, LUCIA S, PIN F, RANJBAR K, HULMI JJ, et al. Moderate
12 exercise in mice improves cancer plus chemotherapy-induced muscle wasting and
13 mitochondrial alterations. **The FASEB Journal**, 2019, 33: 5482-5494.
- 14 32 KLASSEN O, SCHMIDT ME, ULRICH CM, SCHNEEWEISS A, POTTHOFF K,
15 STEINDORF K, et al. Muscle strength in breast cancer patients receiving different treatment
16 regimes. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, 2017, 8: 305-316.
- 17 33 OZORIO GA, BARÃO K & FORONES NM. Cachexia Stage, Patient-Generated Subjective
18 Global Assessment, Phase Angle, and Handgrip Strength in Patients with Gastrointestinal
19 Cancer. **Nutrition and Cancer**, 2017, 69: 772-779.
- 20 34 HUOT JR, NOVINGER LJ, PIN F, BONETTO A. HCT116 colorectal liver metastases
21 exacerbate muscle wasting in a mouse model for the study of colorectal cancer cachexia.
22 **Disease Models & Mechanisms**, 2020, 13: 1-10.
- 23 35 PIN F, BUSQUETS S, TOLEDO M, CAMPERI A, LOPEZ-SORIANO FJ, COSTELLI P, et
24 al. combination of exercise training and erythropoietin prevents cancer-induced muscle
25 alteration. **Oncotarget**, 2015, 6: 43202-43215.
- 26 36 FOULADIN M, KORNER U, GUNNEBO L, SIXT-AMMILON P, BOSAEUS I, LUNDHOLM
27 K. Daily Physical-Rest Activities in Relation to Nutritional State, Metabolism, and Quality of
28 Life in Cancer Patients with Progressive Cachexia. **Clin Cancer Res**, 2017, 13: 6379-6385.
- 29 37 CAN A, DAO DT, ARAD M, TERRILLION CE, PIANTADOSI SC, GOULD TD. The Mouse
30 Forced Swim Test. **Journal of Visualized Experiments**, 2012, 59: 1-5.
- 31 38 QAISAR R, KARIM A & ELMOSELHI AB. Muscle unloading: A comparison between
32 spaceflight and ground-based models. **Acta Physiologica**, 2020, 228: 1-22.
- 33 39 CARSON JÁ, HARDEE JP & VANDERVEEN BN. The Emerging Role of Skeletal Muscle
34 Metabolism as a Biological Target and Cellular Regulator of Cancer-Induced Muscle Wasting.
35 **Semin Cell Dev Biol**, 2016, 54: 53-67.
- 36 40 BROWN JL, ROSA-CALDWELL ME, LEE DE, BLACKWELL BA, BROWN LA, PERRY RA,
37 et al. Mitochondrial degeneration precedes the development of muscle atrophy in progression
38 of cancer cachexia in tumour-bearing mice. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**,
39 2017, 8: 926–938.

- 1 41 NEYROUD D, NOSACKA RL, JUDGE AR, HEPPLER RT. Colon 26 Adenocarcinoma (C26)
2 - Induced Cancer Cachexia Impairs Skeletal Muscle Mitochondrial Function and Content. **J**
3 **Muscle Res Cell Motil**, 2019, 40: 59-65.
- 4 42 MARIN-CORRAL J, FONTES CC, PASCUAL-GUARDIA S, SANCHEZ F, OLIVAN M,
5 ARGILÉS JM, et al. Redox Balance and Carbonylated Proteins in Limb and Heart Muscles of
6 Cachectic Rats. **Antioxidants & Redox Signaling**, 2010, 12: 365-380.
- 7 43 BARREIRO E, PUENTE B, BUSQUETS S, LÓPEZ-SORIANO, GEA J, ARGILÉS JM. Both
8 oxidative and nitrosative stress are associated with muscle wasting in tumour-bearing rats.
9 **FEBS Letters**, 2005, 579: 1646-1652.
- 10 44 ROBERTS BM, FRYE GS, AHN B, FERREIRA LF, JUDGE AR. Cancer cachexia decreases
11 specific force and accelerates fatigue in limb muscle. **Biochem Biophys Res Commun**, 2013,
12 435: 488-92.
- 13 45 WU X, GAO YF, ZHAO XH, CUI JH. Effects of tetramethylpyrazine on nitric oxide synthase
14 activity and calcium ion concentration of skeletal muscle in hindlimb unloading rats. **Zhong**
15 **hua yi xue za zhi**, 2012, 92: 2075–2077.
- 16 46 ARGILES JM, LÓPEZ-SORIANO FJ, TOLEDO M, BETANCOURT A, SERPE R,
17 BUSQUETS S. The caquexia score (CASCO): a new tool for staging cachectic cancer patients.
18 **J Cachexia Sarcopenia Muscle**, 2011, 2: 87:93.
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29

Table 1. Comparison of ACASCO Score in Pcaq and Caq after C26 s.c. inoculation.

| Symptom | % | Measurements | Total Score | Parameters | Criteria | Points | Score T7 | Score T14 | | |
|---|----|----------------------------|------------------|-------------|-----------------------|-----------------------|-----------------|-----------|-----|---|
| Body and GSN weight loss | 40 | Body weight loss (BWL) | 32 | | <2 | 0 | 16 | 24 | | |
| | | | | | >2 | 8 | | | | |
| | | | | | >12 | 16 | | | | |
| | | | | | >15 | 24 | | | | |
| | | | | | >25 | 32 | | | | |
| | | GSN weight loss | 8 | <10 | BWL points x 0 | 1 | 6 | | | |
| | | >10 | BWL points x 1 | | | | | | | |
| | | >20 | BWL points x 1.5 | | | | | | | |
| Inflammation/ metabolic disturbances | 22 | Inflammation | 8 | Plasma IL-6 | Difference vs control | 8 | 8 | 0 | | |
| | | Metabolic Disturbances | 14 | | Proteolysis | Difference vs control | 3.5 | 0 | 3.5 | |
| | | | | | Plasma triglycerides | Difference vs control | 3.5 | 3.5 | 3.5 | |
| | | | | | Plasma glucose | Difference vs control | 3.5 | 3.5 | 3.5 | |
| | | | | | Hematocrit | Difference vs control | 3.5 | 0 | 3.5 | |
| Physical activity | 10 | Total physical activity | 6 | | 0 to 9.99 | 0 | 0 | 3 | | |
| | | | | | 10 to 20.99 | 3 | | | | |
| | | | | | ≥21 | 6 | | | | |
| | | Handgrip strength | 4 | | | 0 to 4.99 | 0 | 1 | 2 | |
| | | | | | | 5 to 20.99 | 1 | | | |
| | | | | | | 21 to 30.99 | 2 | | | |
| | | ≥31 | 4 | | | | | | | |
| Anorexia | 10 | Decrease of food intake | 10 | | 0 to 4.99% | 0 | 5 | 10 | | |
| | | | | | 5% to 19.99% | 5 | | | | |
| | | | | | 20% to 29.99% | 7 | | | | |
| | | | | | ≥30% | 10 | | | | |
| Quality of life | 10 | Discomfort symptoms | 1 | | 0 - 2 | 0 | 0 | 1 | | |
| | | | | | 3 - 6 | 1 | | | | |
| | | | | | 4 - 6 | 1.5 | | | | |
| | | Intruder-resident paradigm | 4 | | | | Very interested | 0 | 1 | 2 |
| | | | | | | | Interested | 1 | | |
| | | | | | | | Little interest | 2 | | |
| | | | | | | | No interest | 4 | | |
| | | Forced swim test | 5 | | | | 0 to 9.99% | 0 | 2 | 3 |
| | | | | | | | 10% to 30.99% | 2 | | |
| | | | | | | | 31% to 60.99% | 3 | | |
| | | ≥61% | 5 | | | | | | | |
| Total Score | | | | | | 92 | 41 | 65 | | |

ACASCO components and their relative scores considering 7 and 14 days after cachexia induced by C26 colorectal experimental model, in Balb/c mice.

Table 2. Colon 26 carcinoma model: statistical analysis of the differences between the changes observed vs the control (non-tumor bearing) animals

| Parameter | Day 7 | Day 14 |
|--|-------|--------|
| Body weight loss | 0.540 | 0.001 |
| GAST weight loss | 0.018 | 0.545 |
| Interleukin-6 | 0.904 | 0.028 |
| Proteolysis | 0.120 | 0.004 |
| Triglycerides | 0.007 | 0.0079 |
| Glucose | 0.004 | 0.0001 |
| Hematocrit | 0.999 | 0.003 |
| Decrease in total physical activity | 0.120 | 0.900 |
| Decrease in handgrip strength | 0.290 | 0.0001 |
| Decrease in food intake | 0.118 | 0.006 |
| Discomfort symptoms | 0.141 | 0.0003 |
| Decrease in intruder-resident paradigm | 0.544 | 0.011 |
| Decrease in forced swim test | 0.125 | 0.006 |

The results represent statistical differences observed between the mean values of the different groups. Body weight loss and gastrocnemius (GAST) weight loss calculations are described in the Methods section, IL-6 was expressed in pg/mL, Triglycerides were expressed in mg/dL, glucose was expressed in mg/dL. Hematocrit was calculated as percentage of packed cell volume to total blood volume. Total physical activity was referenced to the control group Handgrip strength or grip force was measured in g and the parameter was referenced to the control group. Food intake was referenced to the control Group. Discomfort symptoms are described in the Methods section. The intruderresident paradigm and forced swim test were evaluated using a rating scale established to determine the level of interest of the resident-intruder and the time during which the animals were trying to escape from the water, respectively. Numbers represent p value in the comparison of their respective Control groups. Grey blocks show $p < 0.05$ in the comparisons by unpaired t Student's test.

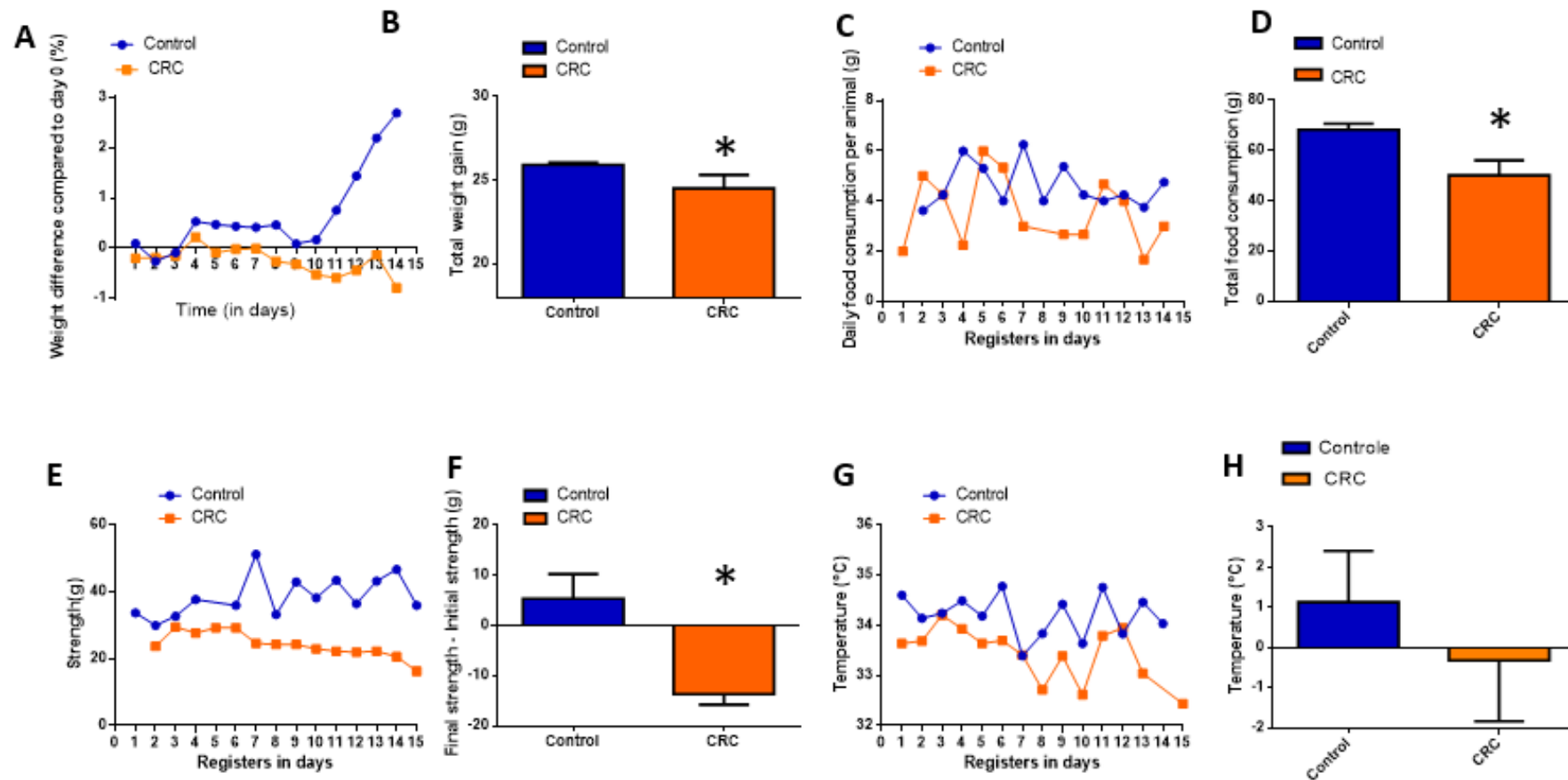


Figure 1. Understanding cancer-induced cachexia after inoculation of C26 cells. **(A and B)** Progression of weight gain in Control and CRC groups. **(C)** Daily food consumption; **(D)** Total food consumed by the groups, in the total period of the experiment; **(E)** Progression of strength assessed by Hand Grip Test; **(F)** Graphical representation of the loss of strength in both groups; **(G)** Progression of body temperature; **(H)** Graphical representation of the differences between temperature at 14th day and at day 0. When represented by dot+line graphs, the results represent mean. When represented by graph bars, the results represent $M \pm SEM$; * $p < 0.05$, when compared by unpaired Student's t test. CRC = colon rectal cancer. $n = 5$ animals/group.

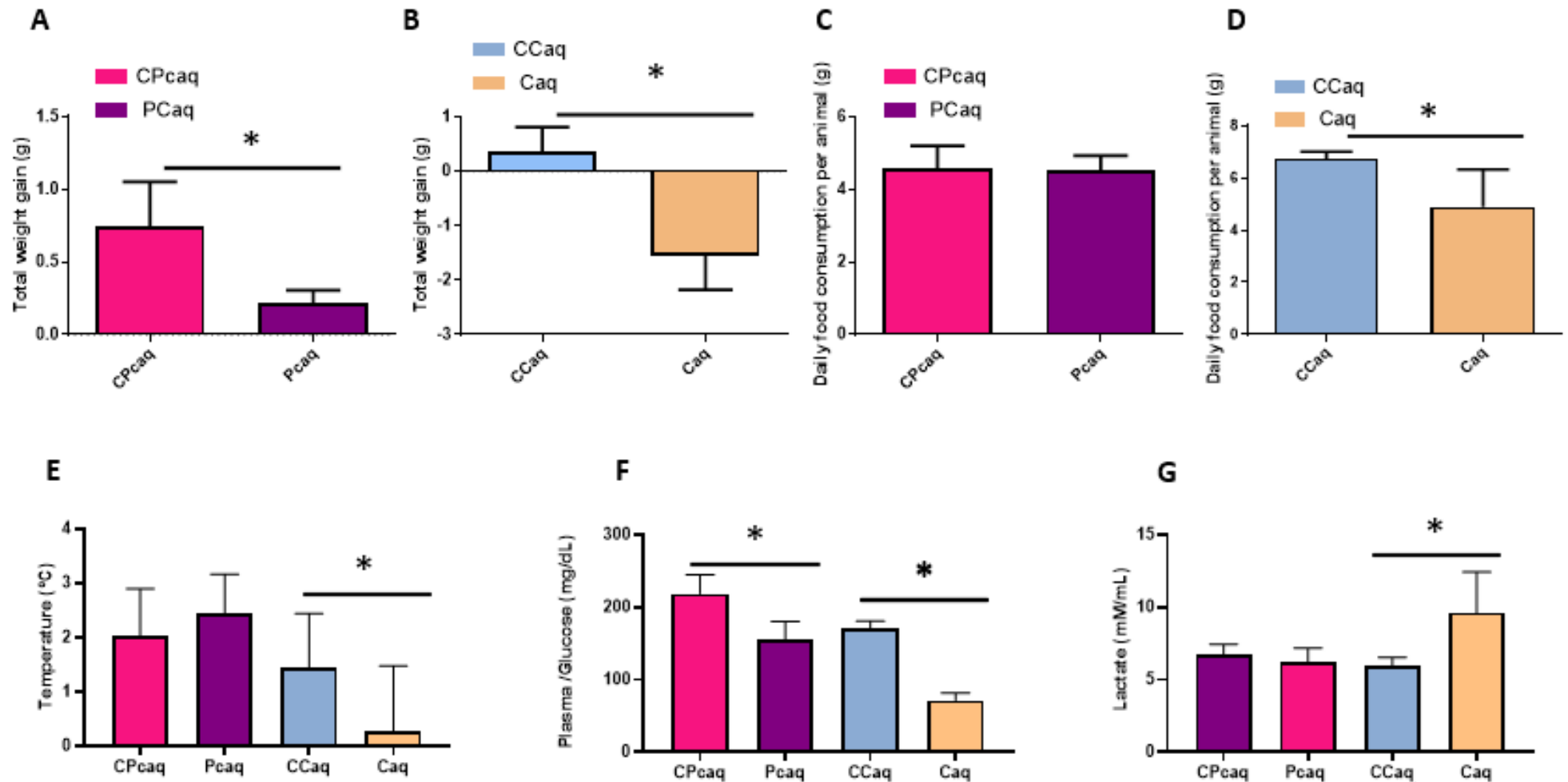


Figure 2. Representation of the differences in parameters of cachexia assessment, when classified as Precachexia (Pcaq - 7 days) and Cachexia (Caq - 14 days) after s.c. inoculation of C26 cells. **(A and B)** Weight gain (weight final – weight initial); **(C and D)** Food consumption; **(E and F)** Body Temperature; **(G and H)** Blood glucose. Results represent M ± SEM; * $p < 0.05$ when evaluated by unpaired t Student's test. n = 9 animals/group.

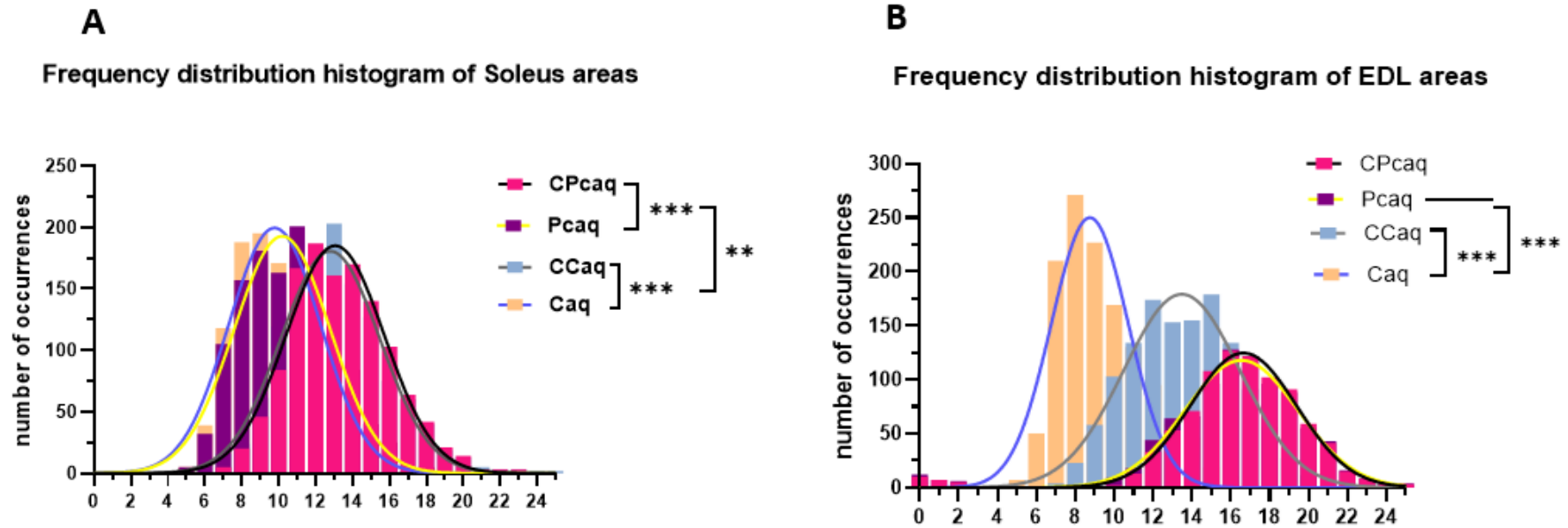


Figure 3. Representation of qualitative differences in muscle mass loss in Pcaq and Caq after s.c. inoculation of C26 cells. **(A)** Histogram of frequency of area distribution from Soleus muscle; **(B)** Histogram of frequency of area distribution from EDL muscle. $**p < 0.01$, and $***p < 0.001$ when evaluated by two-way ANOVA followed by Tukey's *post hoc* test. $n = 3$ animals/group.

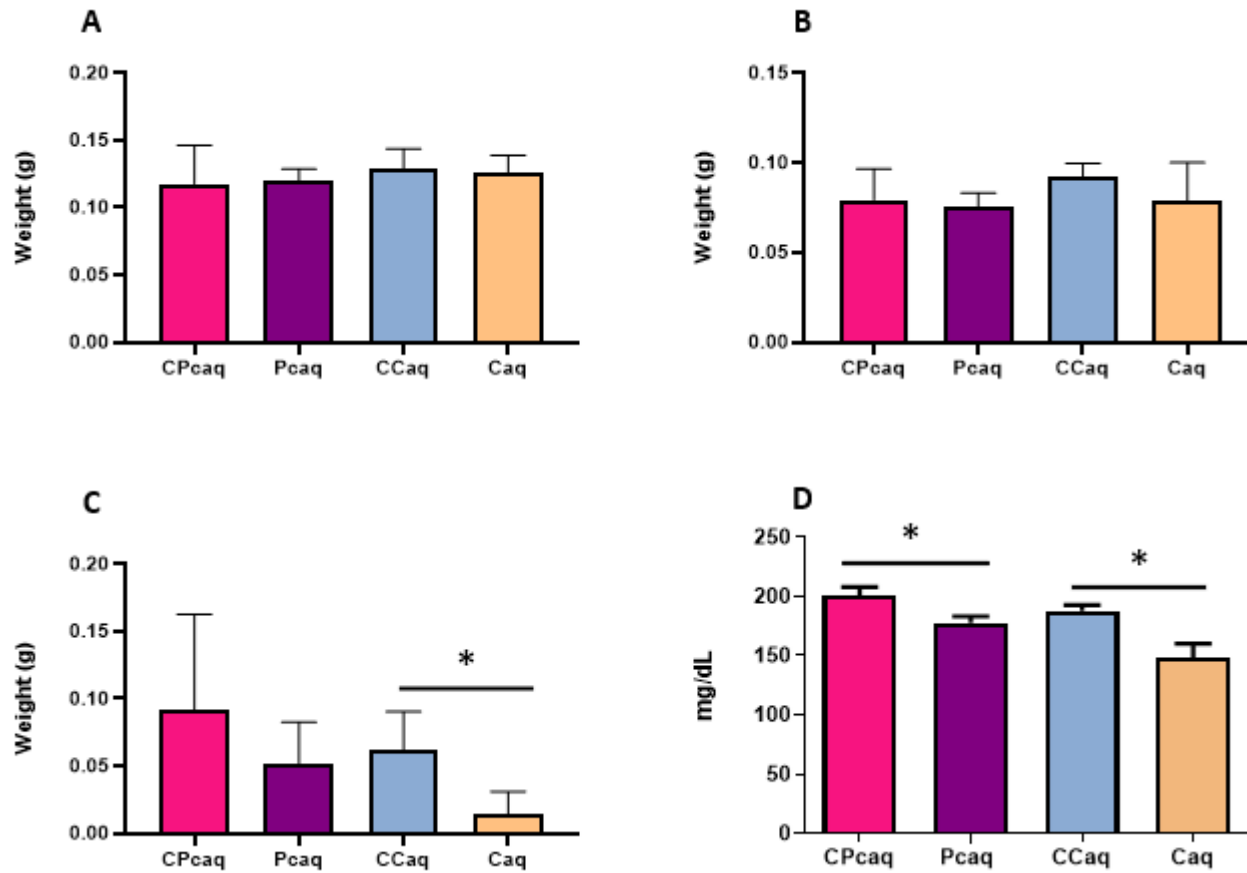


Figure 4. Representation of differences in heart weight and fat mass in Pcaq and Caq after s.c. inoculation of C26 cells. **(A)** Heart weight, in grams; **(B)** brown adipose tissue (removed from the interscapular region); **(C)** white adipose tissue (sum of retroperitoneal and perigonadal region); **(D)** Plasma triglycerides levels, in mg/dL. The results represent $M \pm SEM$; * $p < 0.05$ when compared by unpaired Student's t test. $n = 9$ animals/group.

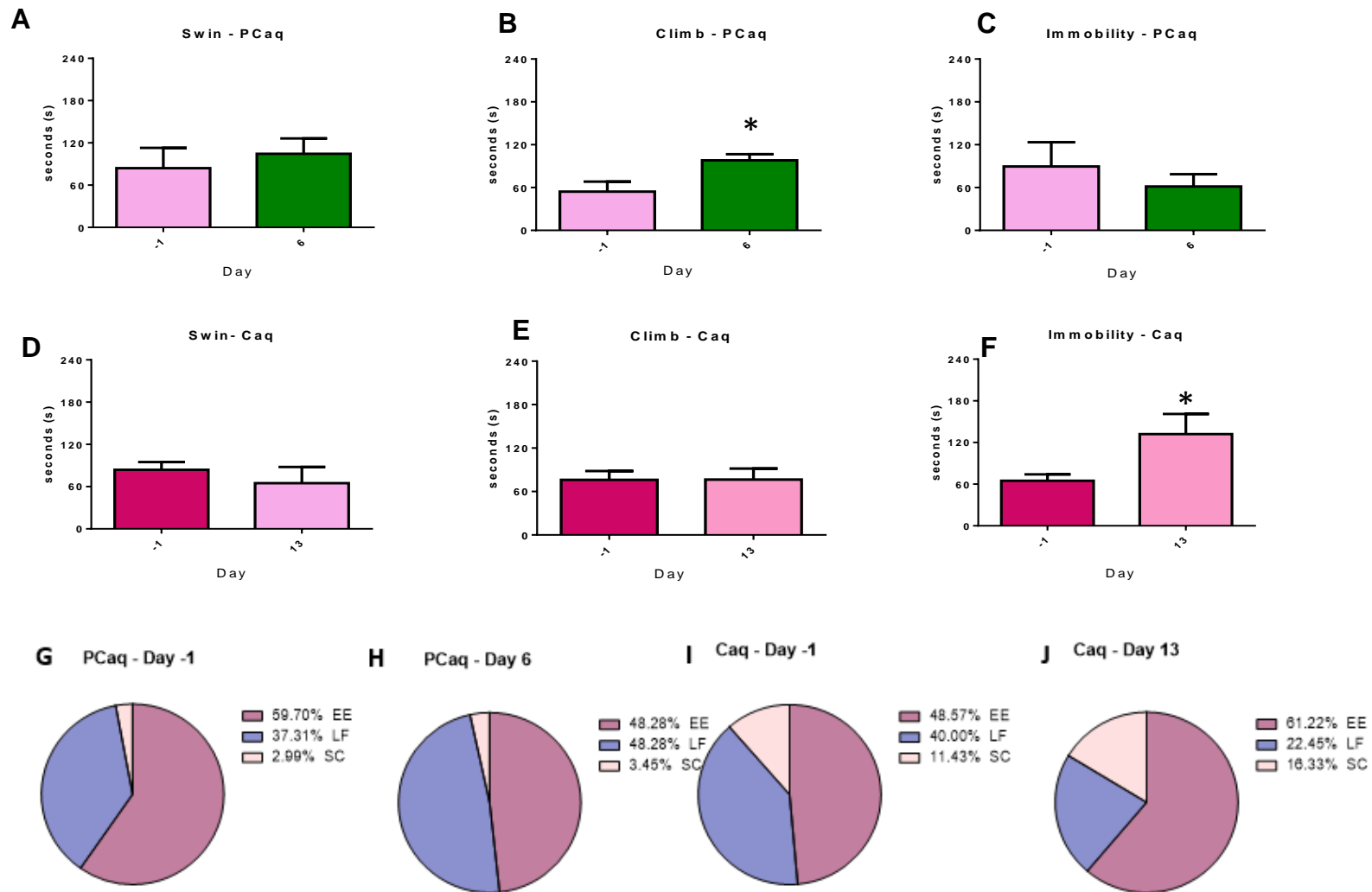


Figure 5. Graphical representation of the differences in the forced swimming test, in Pcaq and Caq after s.c. inoculation of C26 cells (A-F). (Times of A - swimming, B - climbing and C - immobility) Group PCaq on days -1 and 6. (D - swimming, E - climbing and F - immobility) Group Caq on days -1 and 13. The test lasted 6 min. The results represent $M \pm SEM$; * $p < 0.05$ when assessed by unpaired Student's t. Cage mobility (G-J) in Pcaq and Caq after s.c. inoculation of C26 cells. (G and H) PCaq Group on days -1 and 6. (I and J) Caq Group on days -1 and 13. The test lasted 30 min. EE: exploration of the environment; LF: looking for food; SF: self-cleaning. $n = 6$ animals/group.

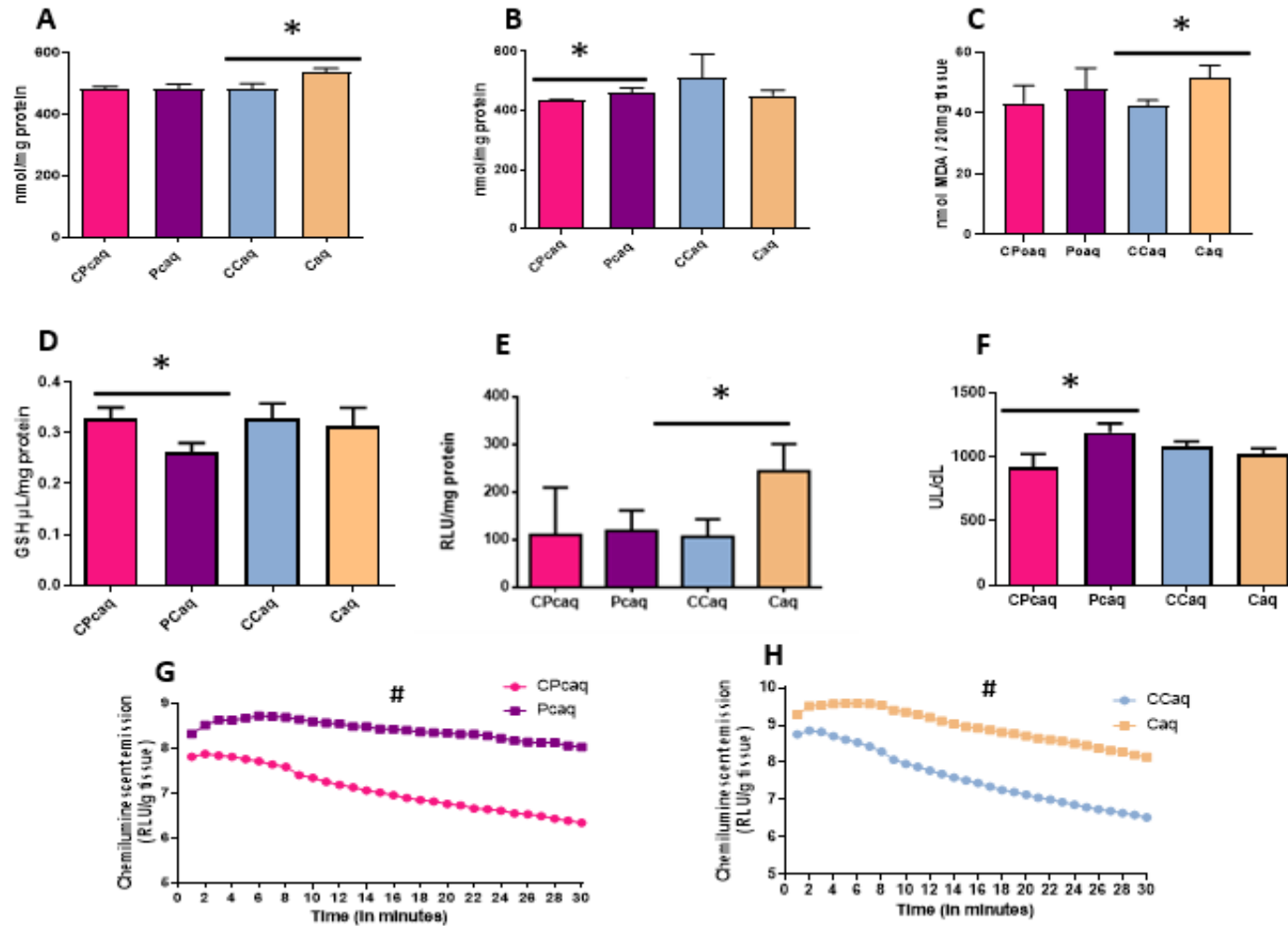


Figure 6. Oxidative stress in muscles of cachectic C26 mice. (A) Carbonyl proteins assayed in SOL; (B) Carbonyl proteins assayed in EDL; (C) MDA levels assayed by TBARS in Gastrocnemius muscle; (D) Quantification of GSH in GAST muscle; (E and F) butyl hydroperoxide-initiated chemiluminescence in GAST muscle. The results represent $M \pm SEM$ (A-F). Dots+line represents mean of interpolated values (G-H). * $p < 0.05$ when assessed by unpaired t Student's t test. # $p < 0.0001$ when evaluated by two-way ANOVA (semi-quantitative analysis of mean curves). CL: chemiluminescence; MDA: malondialdehyde. $n = 5$ animals/group.

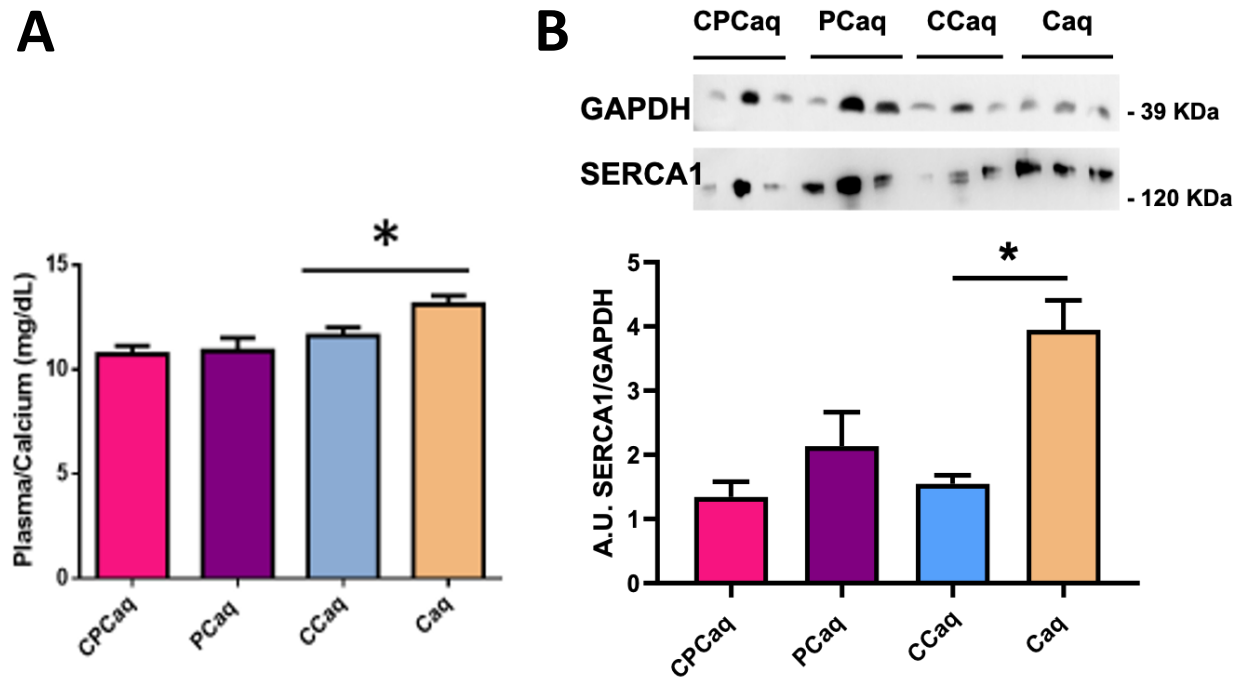


Figure 7. Ca^{2+} plasma levels and amounts of muscle SERCA in C26-induced cachexia, over time. **(A)** Plasma calcium concentration determined by colorimetric kit; **(B)** SERCA1 protein assayed by western blot in SOL. Results represent $M \pm \text{SEM}$. * $p < 0.05$ when assessed by unpaired t Student's t test. (A) $n = 5$ animals/group, (B) $n = 3$ animals/group. SERCA1: sarcoplasmic/endoplasmic Ca^{2+} -ATPase; GAPDH: Glyceraldehyde 3 -phosphate dehydrogenase, considered housekeeping for western blot assay; AU: arbitrary units.

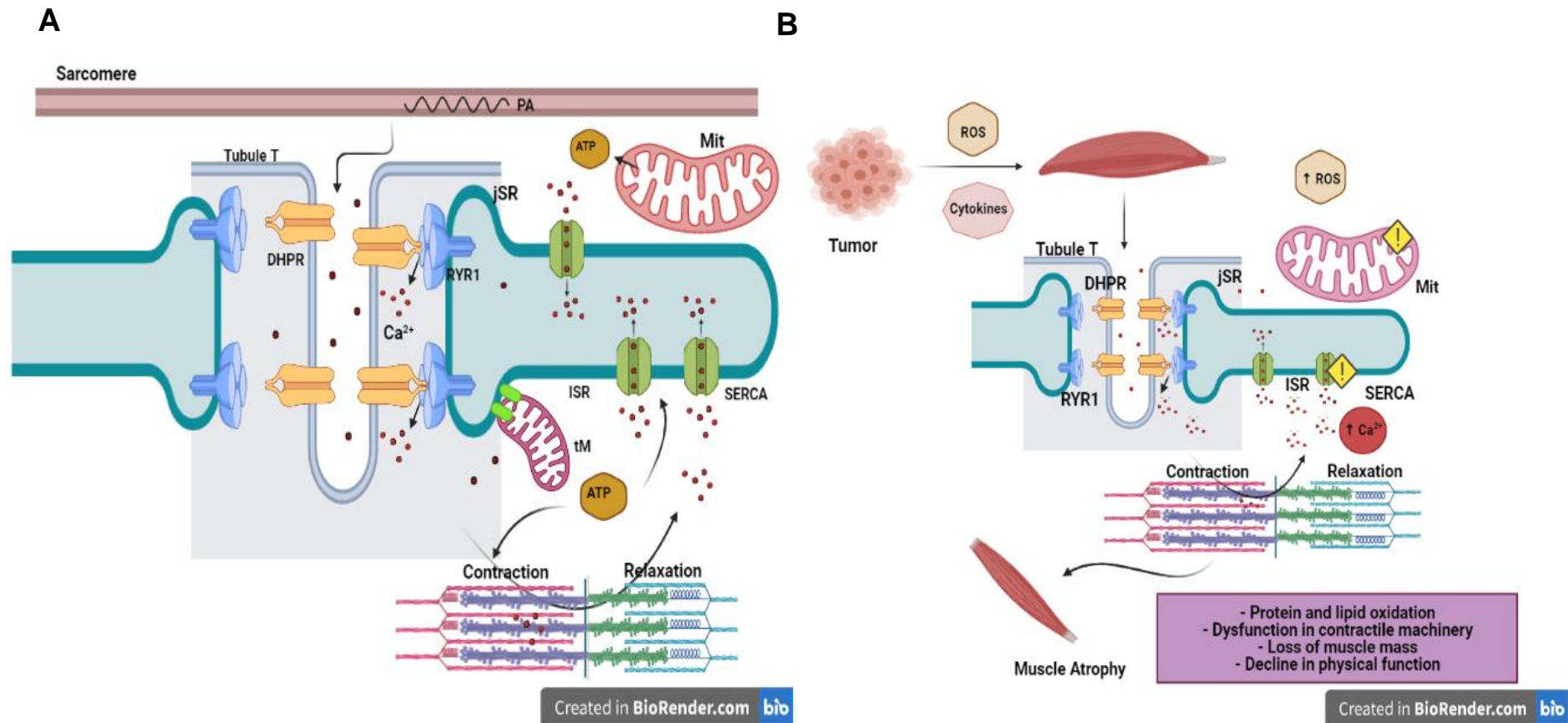


Figure 8. A) EC coupling under normal conditions: The action potential is triggered, the depolarization of the TT is detected by its receiver, the DHPR. DHPR is in close physical contact with RyR1 jSR which, in turn, is also connected with triadic mitochondria (tM), RyR1 opens and Ca^{2+} leaves SR, SERCA pumps are distributed in the ISR and promote the uptake of Ca^{2+} in SR. **B) EC coupling under pathological conditions:** The production of ROS by the tumor leads to mitochondrial dysfunction, which in turn will increase the production of mitochondrial ROS, promote the oxidation of proteins and lipids, disorder in the functioning of the SERCA / ATPase pump, increasing the levels of Ca^{2+} in the cytosol, compromising muscle structure and function. Mit: Mitochondria; SR: sarcoplasmic reticulum.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente estudo mostramos um modelo experimental de caquexia confiável e capaz de cumprir parâmetros importantes para a classificação da caquexia, além de poder avaliar diferenças na perda da qualidade do músculo esquelético ao longo do tempo. Em resumo, nossos achados indicam que, no modelo aqui empregado, as fibras oxidativas parecem estar comprometidas na caquexia, o que pode indicar um comprometimento mitocondrial que leva à produção de ERO e à oxidação de proteínas contráteis musculares, com consequente perda de massa muscular e redução da função física. As diferenças encontradas precocemente nas fibras predominantemente glicolíticas são positivamente correlacionadas com mudanças oxidativas na estrutura de membrana e possível envolvimento do RS em um estágio muito antecipado da síndrome.

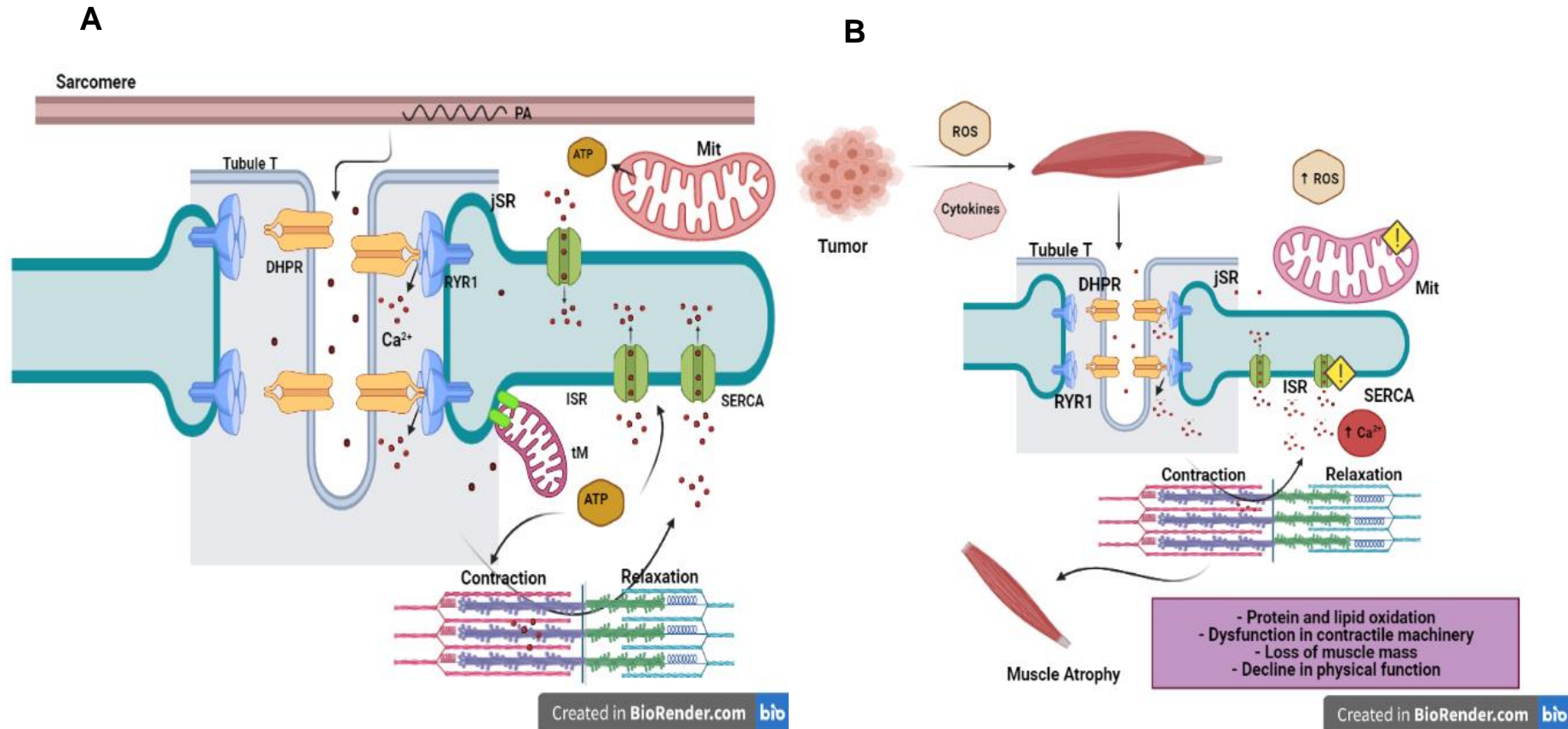
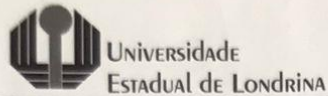


Figura 5 A) Acoplamento EC em condições normais: O potencial de ação é acionado, a despolarização do TT é detectada por seu receptor, o DHPR. DHPR está em contato físico próximo com RyR1 jSR que, por sua vez, também está conectado com mitocôndrias triádicas (tM), RyR1 abre e Ca^{2+} sai de SR, bombas SERCA são distribuídas em ISR e promovem a captação de Ca^{2+} em SR. **B) Acoplamento de EC em condições patológicas:** A produção de ROS pelo tumor leva à disfunção mitocondrial, que por sua vez aumentará a produção de ROS mitocondriais, promoverá a oxidação de proteínas e lipídios, distúrbio no funcionamento da bomba SERCA / ATPase, aumentando os níveis de Ca^{2+} no citosol, comprometendo a estrutura e função muscular. **Mit:** Mitocôndria; **SR:** retículo sarcoplasmático.

ANEXO 2



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 206/2018

Londrina, 05 de dezembro de 2018.

Prezado (a) professor (a)

Certificamos que o projeto intitulado: "Envolvimento das modificações estruturais, moleculares e oxidativas do músculo esquelético como fundamentais indutores da perda de massa magra durante a progressão da caquexia induzida por câncer colo retal (C26): influência sobre a severidade e diminuição da sobrevida pela quimioterapia com oxaliplatina" registrado sob processo CEUA nº 18592.2018.87 sob a responsabilidade de Flávia Alessandra Guarnier que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UDEL), em **05/12/2018**.

O objetivo deste projeto é promover uma avaliação temporal das modificações estruturais de mitocôndria, energéticas e oxidativas do músculo esquelético, durante a evolução da caquexia induzida por células de câncer colo retal, classificando a caquexia durante a sua mudança de pré-caquexia, para caquexia e caquexia refratária, assim como avaliar se o tratamento com o quimioterápico oxaliplatina, extensamente utilizado para tratamento desse tipo de câncer, acelera a perda de massa e os parâmetros avaliados. Ainda, verificar se o tratamento com antioxidante que já possui uso na prática clínica, seria capaz de atenuar a indução de caquexia, melhorando a sua classificação no tempo e a sobrevida. Grau de invasividade=3.

| | |
|----------------------------|---|
| Finalidade | () Ensino (x) Pesquisa científica |
| Vigência da autorização | 15/01/2019 a 15/01/2022 |
| Espécie/ linhagem/ raça | Camundongo Isogênico/ BALB/c |
| Nº de animais | 270 |
| Peso/ Idade | 20-25 g |
| Sexo | Machos |
| Origem | Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá (UEM) |
| Amostras a serem coletadas | Músculos gastrocnêmio, Músculos extensor longo dos dedos (EDL), Músculos tibial anterior, Sangue. |

Cumpra orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/UDEL anteriormente à execução das modificações.

Coloco-me à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessários. Sem mais para o momento, subscrevo, cordialmente.

Maria Fernanda R. Graciano
 Prof.ª. Dra. Maria Fernanda Rodrigues Graciano
 Coordenadora da CEUA/UDEL

Ilmo.(a) Sr.(a)
Prof. (a) Dr (a). Flávia Alessandra Guarnier
 Responsável pelo projeto
 Departamento de Ciências Patológicas/CCB
 C/C para a Chefia do Departamento de Ciências Patológicas/CCB
 C/C para a Direção de Centro do CCB