

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**Doutorado**

**EFEITOS DO RESVERATROL NA CAQUEXIA INDUZIDA  
POR TUMOR**

ELIS CABRAL VICTOR

São Luís

2021

ELIS CABRAL VICTOR

**EFEITOS DO RESVERATROL NA CAQUEXIA INDUZIDA  
POR TUMOR**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão como requisito para obtenção de título de Doutora em Ciências da Saúde.

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Paula Silva de Azevedo dos Santos

São Luís

2021

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).  
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

Cabral Victor, Elis.

EFEITOS DO RESVERATROL NA CAQUEXIA INDUZIDA POR TUMOR /  
Elis Cabral Victor. - 2021.

97 p.

Orientador(a): Ana Paula Silva de Azevedo dos Santos.  
Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em  
Ciências da Saúde/ccbs, Universidade Federal do Maranhão,  
São Luís, 2021.

1. Caquexia neoplásica. 2. Polifenol. 3. Tumor de  
Ehrlich. I. Silva de Azevedo dos Santos, Ana Paula. II.  
Título. |

ELIS CABRAL VICTOR

**EFEITOS DO RESVERATROL NA CAQUEXIA INDUZIDA  
POR TUMOR**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão, como requisito para obtenção do título de Doutora em Ciências da Saúde.

Aprovada em        /        /

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Paula Silva de Azevedo dos Santos (Orientadora)  
Universidade Federal do Maranhão

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Raquel Agnelli Mesquita (Externa)  
Universidade Nove de Julho

---

Prof. Dr. Rui Miguel Costa  
Universidade Federal do Maranhão

---

Prof. Dr. Rafael Cardoso Carvalho  
Universidade Federal do Maranhão

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Janaina Oliveira Brito-Monzani (Memória)  
Universidade Federal do Maranhão

“A perplexidade é o início do  
conhecimento”

*Khalil Gibran*

*Dedico este trabalho ao amor da minha vida, minha filha Júlia, que deu um sentido especial a minha existência e que me dá forças para superar qualquer obstáculo.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço principalmente a Deus por me dar força e paciência para completar esse objetivo de vida.

À minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Paula Silva de Azevedo dos Santos por me aceitar como sua primeira aluna do Doutorado, respeitar minhas limitações e me ensinar a superá-las, certamente possui grande influência no meu crescimento profissional e pessoal;

A minha filha, meu amor incondicional que é minha grande inspiração para os meus dias de luta e que me ensina a todo momento sobre superação de vida;

Aos meus pais, que mesmo distantes sempre me apoiaram nos momentos difíceis e não me deixaram desistir nos momentos de desespero;

Aos meus amigos nesta longa jornada, por me darem força e colaboração, Sulayne, Mirtes, Leticia, André e Mauricio (IC) obrigada que ainda durante o doutorado me deram muita força diante de momentos pessoais difíceis;

Aos meus amigos de vida de São Paulo (Shayane, Izabel, Fabiana e Ariana), do Maranhão (Rodrigo, Mayara e Saulo) e ao meu gêmeo e grande amigo Daniel por tudo, pela força, carinho e ajuda, amo vocês;

A todos os professores do programa de ciências da saúde – UFMA, ao LIAC e LIF pelo suporte e apoio estrutural e científico.

A CAPES, FAPEMA e UFMA pelo apoio financeiro que permitiram o desenvolvimento dessa pesquisa.

Obrigada por tudo!

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Distribuição proporcional dos tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020 por sexo, exceto pele não melanoma. (INCA, 2020)	15
<b>Figura 2.</b> Estruturas do tecido muscular esquelético	20
<b>Figura 3.</b> Esquema experimental	27
<b>Figura 4.</b> Imagem histológica transversal do musculo	30
<b>Figura 5.</b> Efeito da inoculação do tumor sólido de Ehrlich no peso do membro com tumor, consumo alimentar, peso da gordura intraperitoneal, peso corporal e peso do músculo (úmido e seco) no modelo de caquexia	34
<b>Figura 6.</b> Cinética do volume no membro inoculada com tumor.	36
<b>Figura 7.</b> Efeito do resveratrol no peso da pata inoculada com tumor	37
<b>Figura 8.</b> Peso úmido do músculo estriado esquelético no modelo de caquexia com tumor sólido de Ehrlich	39
<b>Figura 9.</b> Peso seco do músculo estriado esquelético no modelo de caquexia com tumor sólido de Ehrlich	40
<b>Figura 10.</b> Micrografia do corte transversal do músculo gastrocnêmio	42
<b>Figura 11.</b> Número das fibras do músculo gastrocnêmio dos camundongos no modelo de caquexia com tumor sólido de Ehrlich (HE 200x)	44
<b>Figura 12.</b> Análise da área das fibras do músculo gastrocnêmio obtidas de camundongos no modelo de caquexia com tumor sólido de Ehrlich (HE 200x.)	46

<b>Figura 13.</b> Celularidade da medula osséa no modelo de caquexia com tumor sólido de Ehrlich	48
<b>Figura 14.</b> Celularidade do baço no modelo de caquexia com tumor sólido de Ehrlich	50
<b>Figura 15.</b> Celularidade do linfonodo poplíteo no modelo de caquexia com tumor sólido de Ehrlich	52
<b>Figura 16.</b> Concentração plasmática de IL-6 no modelo de caquexia com tumor sólido de Ehrlich	54
<b>Figura 17.</b> Concentração plasmática de TNF- $\alpha$ no modelo de caquexia com tumor sólido de Ehrlich	56
<b>Figura 18.</b> Concentração plasmática de MIP-1 $\alpha$ no modelo de caquexia com tumor sólido de Ehrlich	58
<b>Figura 19.</b> Concentração de sFasL no modelo de caquexia com tumor sólido de Ehrlich	60
<b>Figura 20.</b> Concentração do LDH no nível plasmático no modelo de caquexia com tumor sólido de Ehrlich	62
<b>Figura 21.</b> Concentração do TGO no nível plasmático no modelo de caquexia com tumor sólido de Ehrlich.	64
<b>Figura 22.</b> Concentração do TGP no nível plasmático no modelo de caquexia com tumor sólido de Ehrlich	65

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida, do inglês, Acquired immunodeficiency syndrome
CPH	Ciclofosfamida
DNA	Ácido desoxirribonucleico
IL-6	Interleucina-6
IL-1	Interleucina-1
IL-1 $\beta$	Interleucina-1 Beta
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LDH	<i>Lactato desidrogenase</i>
MyoD	Fator de transcrição que pertence à família de proteínas "basic helix-loop-helix"
MIP-1a	Macrófago proteína inflamatória alfa <i>do inglês macrophage inflammatory protein 1 alpha</i>
PMN	Leucócitos polimorfonucleares
RSV	Resveratrol
sFasL	Ligante Fas solúvel, do inglês "soluble Fas ligand"
TGO	Transaminase glutâmico-oxalacética
TGP	Transaminase glutâmico pirúvica
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa, do inglês " <i>Tumor Necrosis Factor-alfa</i> "

## RESUMO

O câncer apresenta-se no Brasil como a segunda maior causa de morte nos últimos anos. A caquexia neoplásica é uma síndrome que contribui para maiores índices de morbidade e mortalidade, além de redução da qualidade de vida. Trabalhos anteriores descreveram que camundongos portadores de tumor sólido de Ehrlich apresentavam perda muscular, evoluindo para um quadro caquético após 14 dias de inoculação, sendo este modelo de estudo *in vivo* aplicável no estudo de drogas com potencial antitumoral. O Resveratrol (RSV) é um polifenol encontrado em alimentos, como a uva e amendoim, sido estudado no tratamento de várias neoplasias. Contudo, apesar de dados promissores na atividade antitumoral, não existem estudos com esse composto na caquexia neoplásica. O objetivo foi avaliar os efeitos do RSV na caquexia em modelo de tumor sólido de Ehrlich em tratamento associado ou não com quimioterápico. Para a avaliação da caquexia no modelo *in vivo*, camundongos Swiss machos com idade entre 50 a 60 dias foram divididos em dois grupos (n=10): Normal (sem tratamento e sem tumor) e o Grupo controle negativo (inoculado com  $2 \times 10^7$  células tumorais/mL no coxim plantar, sem tratamento). Os resultados mostraram que mesmo mantendo o peso corporal, o aumento do tumor acompanha um menor consumo de ração, perda de massa muscular e tecido adiposo comparado ao grupo controle, sugerindo o quadro de caquexia neoplásica. Para avaliar o efeito do tratamento, parte dos animais foram inoculados com tumor, como descrito anteriormente, e divididos em: Controle negativo (sem tratamento); Controle positivo (tratado com ciclofosfamida de 25mg/kg, intraperitoneal durante 14 dias); Grupo RSV (10mg/kg, por gavagem durante 14 dias); e Grupo RSV e Ciclofosfamida (10mg/Kg e 25mg/kg, por gavagem e intraperitoneal, respectivamente), e um grupo de animais sem tumor e tratados com Resveratrol na mesma posologia. Os resultados mostraram que a o RSV reduz o crescimento do tumor da mesma forma que a ciclofosfamida. Entretanto, o quimioterápico reduz a celularidade dos órgãos linfoides e eleva os níveis séricos de TNF- $\alpha$  e IL-6 e reduz MCP1, levando uma maior perda muscular, enquanto que o RSV reduziu o TNF- $\alpha$  e aumenta a massa muscular sem causar cito e hepatotoxicidade. O tratamento com RSV e ciclofosfamida apresentou melhora do peso muscular comparado a Ciclofosfamida, mas não alterou os efeitos imunossupressores. A presença de sFasL parece ser um mecanismo associado a inflamação mediada pelo tumor. O RSV, sem a inoculação do tumor, aumenta o número de fibra muscular e não altera parâmetros imunológicos e hepáticos, sugerindo baixa toxicidade. Os resultados sugerem que além do efeito antitumoral, o RSV tem atividade anti-inflamatória capaz de preservar o músculo na caquexia neoplásica, entretanto sem efeito nos mecanismos de perda muscular induzido pelo quimioterápico, desta forma, o presente trabalho ratifica o efeito antitumoral do RSV e evidencia seu potencial no tratamento da caquexia neoplásica.

**Palavras-chave:** Caquexia neoplásica, polifenol, tumor de Ehrlich.

## ABSTRACT

*Cancer appears in Brazil as the second leading cause of death in recent years. Neoplastic cachexia is a syndrome that contributes to higher rates of morbidity and mortality, in addition to reduced quality of life. Previous studies describe that mice with solid Ehrlich tumor showed muscle loss, evolving to a cachectic condition after 14 days of inoculation, and this in vivo study model is applicable in the study of drugs with antitumor potential. Resveratrol (RSV) is a polyphenol found in foods, such as grapes and peanuts, and has been studied in the treatment of several neoplasms. However, despite promising data on antitumor activity, there are no studies with this compound in neoplastic cachexia. The objective was to evaluate the effects of RSV on cachexia in a solid Ehrlich tumor model under treatment associated or not with chemotherapy. For an assessment of cachexia in the in vivo model, male Swiss mice aged 50 to 60 days were divided into two groups (n = 10): Normal (without treatment and without tumor) and the negative control group (inoculated with 2x10<sup>7</sup> tumor cells / mL without foot pad, without treatment). The results impaired that even maintaining body weight, the increase in the tumor accompanied a lower consumption of feed, loss of muscle mass and adipose tissue compared to the control group, suggesting the condition of neoplastic cachexia. To assess the effect of the treatment, part of the animals were inoculated with a tumor, as previously described, and divided into: Negative control (without treatment); Positive control (treated with 25 mg / kg cyclophosphamide, intraperitoneal for 14 days); RSV Group (10mg / kg, per gavage for 14 days); and RSV and Cyclophosphamide Group (10mg / Kg and 25mg / kg, by gavage and intraperitoneal, respectively), and a group of animals without tumor and treated with Resveratrol in the same dosage. The results impaired that RSV reduces tumor growth in the same way as cyclophosphamide. However, chemotherapy reduces the cellularity of lymphoid organs and increases serum levels of TNF- $\alpha$  and IL-6 and reduces MCP1, leading to greater muscle loss, while RSV reduced TNF- $\alpha$  and increases muscle mass without causing cytokinesis. and hepatotoxicity. Treatment with RSV and cyclophosphamide improves muscle weight compared to cyclophosphamide, but does not alter the immunosuppressive effects. The presence of sFasL appears to be a mechanism associated with tumor-mediated inflammation. The RSV, without tumor inoculation, increases the number of muscle fibers and does not alter immunological and hepatic parameters, suggesting low toxicity. The results suggest that in addition to the anti-tumor effect, RSV has anti-inflammatory activity capable of preserving muscle in neoplastic cachexia, however without effect on the mechanisms of muscle loss induced by chemotherapy, therefore, the present study ratifies the anti-tumor effect of RSV and shows its potential in the treatment of neoplastic cachexia.*

**Keywords:** *Neoplastic cachexia, polyphenol, Ehrlich tumor.*

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>15</b>
2.1	EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER.....	15
2.2	CÂNCER E A CARCINOGENESE.....	16
2.3	MÚSCULO ESQUELÉTICO.....	19
2.4	CAQUEXIA NEOPLÁSICA .....	20
2.5	MODELO ANIMAL PARA ESTUDO DA CAQUEXIA NEOPLÁSICA .....	22
2.6	RESVERATROL.....	23
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>25</b>
3.1	OBJETIVO GERAL.....	25
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>26</b>
4.1	ANIMAIS.....	25
4.2	MANUTENÇÃO DO TUMOR ASCÍTICO DE EHRlich.....	25
4.3	DESENHO EXPERIMENTAL.....	25
4.4	PREPARO DAS CÉLULAS PARA INOCULAÇÃO .....	28
4.5	AVALIAÇÃO DO TUMOR .....	29
4.6	AVALIAÇÃO DO TECIDO MUSCULAR .....	29
4.8	AVALIAÇÃO DOS ÓRGÃOS LINFOIDES.....	31
4.9	DOSAGEM DE CITOCINAS PLASMÁTICAS.....	31
4.10	AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS.....	31
4.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	32
<b>5</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>33</b>
5.1	MODELO EXPERIMENTAL DA CAQUEXIA NEOPLÁSICA.....	33
5.2	O RESVERATROL REDUZ O DESENVOLVIMENTO DO TUMOR SÓLIDO DE EHRlich. ....	35
5.3	RSV NA MANUTENÇÃO DO MÚSCULO ESTRIADO ESQUELÉTICO NO MODELO DE CAQUEXIA COM TUMOR DE EHRlich .....	38
5.4	AVALIAÇÃO DO RESVERATROL NA CELULARIDADE DE ÓRGÃOS DO SISTEMA IMUNE NO MODELO DE CAQUEXIA COM TUMOR SÓLIDO DE EHRlich.....	47
5.5	AVALIAÇÃO DO RESVERATROL EM MEDIADORES INFLAMATÓRIOS NO MODELO DE CAQUEXIA COM TUMOR SÓLIDO DE EHRlich	53
5.6	AVALIAÇÃO DO RESVERATROL NA INDUÇÃO DE MEDIADOR PRÓ-APOPTOTICO NO MODELO DE CAQUEXIA COM TUMOR SÓLIDO DE EHRlich .....	59

5.7	EFEITO DO RESVERATROL EM PARÂMETROS BIOQUÍMICOS NO MODELO DE CAQUEXIA COM TUMOR DE EHRlich.....	61
6	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>66</b>
7	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>76</b>
8	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>77</b>
9	<b>ANEXOS</b> .....	<b>95</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O câncer no contexto mundial tem se consolidado como um problema de saúde pública, sendo uma das doenças com maior frequência de diagnóstico e incidência de morte humana, isso se mostra pelos regimes de tratamento intensos e ou cirurgias necessárias para tratar essa malignidade. Um diagnóstico de câncer representa um estigma social, com grande ônus econômico para a família envolvida, bem como para a comunidade e a sociedade (INCA, 2020).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), o câncer hoje é a segunda causa de morte em países desenvolvidos, perdendo apenas para as doenças cardiovasculares, gerando um impacto de 190 mil mortes por ano (WHO, 2017; SIM, 2009; INCA, 2020). A doença surge a partir de células normais que sofrem alterações nas sequencias genéticas, podendo gerar resultados em uma variedade de fatores, como mutações genéticas herdadas ou erros aleatórios na replicação do DNA, ou danos e instabilidade genética induzida por radiação, por substâncias químicas ou por infecção viral (SHANMUGAM, 2017; MARELLI et al., 2018).

Além disso, o câncer é uma doença que se relaciona com o sistema imunológico do hospedeiro. O processo de interação do câncer com o sistema imunológico ocorre pela atividade supressora de respostas imunes ou mecanismo de evasão das células tumorais na expressão das moléculas inibitórias do checkpoint imunológico, tais como CTLA-4, PD-1 e o antígeno leucocitário humano não clássico (HLA-G), que são muito importantes para manter a tolerância imunológica na homeostase (CHEN, 2017).

Para entender os mecanismos envolvidos na resposta imune tumoral, o estudo dos componentes celulares e citocinas presentes no microambiente tumoral é fundamental. O infiltrado de células imunes em tumores sólidos é composto de células do sistema imune inato e adaptativo, que incluem células dendríticas, mastócitos, célula natural *killer* (NK), neutrófilos, eosinófilos, linfócitos T, linfócitos B e macrófagos, que podem estar localizados no centro do tumor, no front invasivo ou em estruturas linfoides terciárias (FRIDMAN et al., 2012; BREMMES et al., 2016).

Deste modo, a presença de inflamação crônica dispõe de um microambiente pró-tumoral que pode contribuir para várias características-chaves da progressão do câncer, como sobrevivência, angiogênese, invasão e metástase (FELLER et al., 2013, LIPINSKI et al., 2016).

Uma das complicações nos estágios avançados do câncer é a caquexia, causada pela ativação de citocinas pró-inflamatórias que tem efeito direto sobre o metabolismo muscular (MANTOVANI & MADEDDU, 2010). Assim, pacientes com câncer apresentam, dentre as inúmeras alterações metabólicas, intensa perda de massa corporal magra, em particular musculatura esquelética, que diminui em proporção direta aos efeitos da evolução neoplásica. Como consequência da perda de tecido muscular, ocorre nesses pacientes fadiga, fraqueza, atrofia muscular e comprometimento de muitas funções, dentre elas, respiratórias e cardiovasculares (MULLIGAN & BLOCH, 1998).

As três formas de tratamento do câncer mais comumente utilizadas são: cirurgia, radioterapia e quimioterápicos (INCA, 2018). No entanto, apesar da eficácia desses tratamentos, o uso de quimioterápicos também promove diversos efeitos adversos, no quais incluem mielossupressão, náuseas, vômitos, diarreia e alopecia (MARELLI et al., 2018). Devido aos efeitos colaterais causados, busca-se por novas alternativas que possam auxiliar no tratamento ao câncer.

Dentro das diversas alternativas que objetivam prevenir e/ou tratar os casos de câncer, em conjunto com o tratamento convencional, existe uma escassez de estudos atribuídos a melhora do quadro da caquexia. A literatura científica aponta que o Resveratrol se caracteriza por uma estratégia eficaz, tanto na prevenção como na resposta do sistema imune contra o tumor, como devido à sua atividade moduladora em diversas vias envolvidas no crescimento celular (MUKHERJEE et al. 2010).

Assim, as informações anteriormente mencionadas sugerem a relevância do Resveratrol como estratégia para o tratamento da caquexia associada ao câncer, melhoria na perda do tecido muscular esquelético e diminuição de condições associadas ao aumento de morbidade e mortalidade.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER

A cada ano o câncer tem se consolidado como um problema de saúde pública em todo o mundo (FERLAY et al., 2013). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o câncer é a segunda causa de morte em países desenvolvidos, perdendo apenas para as doenças cardiovasculares, gerando 190 mil mortes por ano (WHO, 2009; SIM, 2009). Os tipos de cânceres mais incidentes no Brasil nos homens são próstata (29,7%), colón e reto (9,1%), pulmão (7,9%), estômago (5,9%) e cavidade oral (5,0%). Em mulheres, as maiores frequências são encontradas na mama (29,2%), colón e reto (9,2%), colo do útero (7,4%), pulmão (5,6%), e glândula tireoide (5,4%) (INCA, 2020).

Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), o número de casos novos de câncer de pele não melanoma esperados, para cada ano do triênio 2020-2022, será de 83.770 em homens e de 93.160 em mulheres, correspondendo a um risco estimado de 80,12 casos novos a cada 100 mil homens e 86,65 casos novos a cada 100 mil mulheres, entre os outros tipos o de próstata (65.840mil), mama (66.280mil), colón e reto (40,990 mil), colo do útero (16.370 mil), Pulmões (30.200mil) estômago (21,230 mil). Ao todo estão relacionados na publicação os 19 tipos de câncer mais incidentes, sendo 14 na população masculina e 17 na feminina (INCA, 2020) (Figura 1).

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%		
Próstata	65.840	29,2%	Homens		Mama feminina	66.280	29,7%		
Cólon e reto	20.520	9,1%			Cólon e reto	20.470	9,2%		
Traqueia, brônquio e pulmão	17.760	7,9%			Colo do útero	16.590	7,4%		
Estômago	13.360	5,9%			Traqueia, brônquio e pulmão	12.440	5,6%		
Cavidade oral	11.180	5,0%			Glândula tireoide	11.950	5,4%		
Esôfago	8.690	3,9%			Estômago	7.870	3,5%		
Bexiga	7.590	3,4%			Ovário	6.650	3,0%		
Linfoma não Hodgkin	6.580	2,9%			Corpo do útero	6.540	2,9%		
Laringe	6.470	2,9%			Linfoma não Hodgkin	5.450	2,4%		
Leucemias	5.920	2,6%			Sistema nervoso central	5.220	2,3%		
					Mulheres				

\*Números arredondados para múltiplos de 10.

**Figura 1.** Distribuição proporcional dos tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020 por sexo, exceto pele não melanoma (INCA 2020).

Dados mostram que pacientes com câncer em estágios avançados desenvolvem caquexia, sendo uma consequência de alta incidência por afetar mais de 5 milhões de pessoas, no entanto, existem poucos estudos publicados envolvendo grandes amostras populacionais pela gravidade e agilidade na manifestação da doença. Nos principais países industrializados, a prevalência geral da caquexia de todas as causas é estimada em cerca de 9 milhões de pacientes (ou seja, 1% de pacientes com qualquer doença) e a caquexia pode contribuir diretamente para 30% das mortes por cânceres (TEMEL et al., 2010; VON, et al., 2010).

## 2.2 CÂNCER E A CARCINOGENESE

O Câncer faz parte de um grupo de doenças que afeta diferentes tecidos no organismo. É caracterizado por alterações na expressão de múltiplos genes, levando a desregulação do programa celular normal para divisão e diferenciação celular (PARSONS, 2003). Isso resulta em um desequilíbrio de replicação e morte celular que favorece o crescimento de uma população de células tumorais. As características que diferenciam um tumor maligno de um benigno são as habilidades para invadir localmente, espalhando-se para os linfonodos regionais e gerando metástase para outros órgãos (LUCH, 2005).

O processo da carcinogênese ocorre da conversão de uma célula normal em uma célula neoplásica, sendo que os agentes indutores desse processo são denominados carcinógenos (LOUVEIRO et al., 2002). A exposição repetida à carcinógenos podem levar ao desenvolvimento de tumores malignos (GIGLIO, 2001). Esse desenvolvimento ocorre muito lentamente devido à natureza complexa da carcinogênese, a qual pode ser dividida em três estágios: a iniciação, a promoção e a progressão. No entanto, para que as células se tornem malignas não basta que elas se multipliquem em excesso (NICHOLSON et al., 2008). Elas precisam ignorar as restrições da proliferação celular (mecanismos de apoptose) impostas pelas diferentes partes do organismo, em especial por células vizinhas normais, tornando o processo de morte celular insuficiente para a contenção do câncer (VALKO et al., 2006).

O câncer apresenta diferentes características genéticas, dependendo do tipo que instala no hospedeiro. A maioria dos cânceres se desenvolvem a partir de células que mostram genes de susceptibilidade, são doenças genéticas moleculares adquirida em um único ou alguns clones de células que se acumulam alterações genéticas celulares e progridem para o câncer

desenvolvido. Essas alterações levam a proliferação celular desregulada, invasão e metástase (KLAUSNER, 2002).

Esses mecanismos podem ocorrer através de um problema direto no DNA, como uma mutação genética, translocação, amplificação, deleção, perda de heterozigose ou por meio de mecanismo resultante da transcrição anormal do gene ou tradução. O resultado geral é um desequilíbrio de replicação e morte celular em uma população de células tumorais que leva a uma expansão de tecido tumoral. Em tecidos normais, proliferação celular e perda celular estão em estado de equilíbrio (ONUHCIC AC & CHAMMAS, 2010).

A classificação histológica da malignidade é baseada no grau de diferenciação das células e na estimativa da taxa de crescimento como indicado pelo índice mitótico. Acreditava-se que tumores menos diferenciados fossem mais agressivos e mais metastático do que os tumores mais diferenciados. Agora já se sabe que esta afirmação é uma simplificação excessiva, não sendo a maneira muito precisa de avaliar a malignidade para certos tipos de tumores. Com base nesses critérios, e outros semelhantes, os tumores foram classificados como grau I (75% a 100% de diferenciação), grau II (50% a 75%), grau III (25% a 50%) e grau IV (0% a 25%). O valor da classificação fornece para certos tumores um guia geral para o prognóstico e indicadores da eficácia das abordagens terapêuticas (BURKE, 2004).

O comitê americano de câncer (AJCC) e a União Internacional de Controle do Câncer (UICC) utilizam o sistema de classificação TNM como uma ferramenta para os médicos estadaarem diferentes tipos de câncer com base em determinadas normas. Ele é atualizado a cada 6 a 8 anos para incluir os avanços na compreensão de uma doença como o câncer.

No sistema TNM, a cada tipo de câncer é atribuída uma letra ou número para descrever o tumor, linfonodos e metástases, sendo diferenciado desta forma: (T para o tumor primário), (N para linfonodos. O câncer que se espalhou para os linfonodos próximos), (M para metástase. O câncer que se espalhou para partes distantes do organismo). A categoria T fornece informações sobre aspectos do tumor primário, como seu tamanho, quão profundamente se desenvolveu no órgão em que se originou e quanto invadiu os tecidos adjacentes: (TX significa que o tumor não pode ser avaliado), (T0 significa que não existe evidência de tumor primário, não pode ser encontrado), (Tis significa que as células cancerosas estão se desenvolvendo apenas na camada

mais superficial do tecido, sem invadir tecidos mais profundos. Também pode ser chamado de câncer in situ ou pré-câncer). Os números que aparecem após o T (tais como T1, T2, T3 e T4) podem descrever o tamanho do tumor e/ou a disseminação da doença nas proximidades. Quanto maior o número de T, maior o tumor e/ou mais se disseminou pelos tecidos próximos. A categoria N descreve se o câncer se espalhou para os linfonodos vizinhos: (NX significa que os linfonodos não podem ser avaliados), (N0 significa que os linfonodos vizinhos não contêm câncer). Os números que aparecem após o N (por exemplo, N1, N2 e N3) podem descrever o tamanho, localização e/ou o número dos linfonodos com doença. Quanto maior o número, mais o câncer se espalhou para os linfonodos. A categoria M descreve se o câncer se espalhou (metástases) para locais distantes do corpo: (M0 significa que nenhuma disseminação foi encontrada), (M1 significa que o câncer se espalhou para tecidos e órgãos distantes, metástases à distância foram encontradas). A maioria dos tipos de câncer tem sua própria versão deste sistema de classificação, logo as letras e os números não significam sempre o mesmo para cada tipo de câncer. Por exemplo, em alguns tipos, as categorias T descrevem o tamanho do tumor principal, enquanto em outros, eles descrevem quão profundamente o tumor se desenvolveu, ou se o tumor cresceu nas estruturas adjacentes (independentemente de seu tamanho), (BRIERLEY et al., 2016, WITTEKIND, 2014).

Uma vez que o tumor maligno cresce, ele produz um número de efeitos no hospedeiro, podendo resultar na mortalidade do mesmo. Os efeitos podem incluir febre, anorexia (perda de apetite), perda de peso, caquexia, infecção, anemia e vários sintomas neurológicos, estes podem ocorrer de proporção ao tamanho e tipo do tumor. Um tumor relativamente pequeno pode causar muitos sintomas, enquanto outro tumor pode produzir poucos sintomas e permanecerem ocultos até estarem muito avançados e metastasiados. Tumores malignos afetam as funções do hospedeiro por compressão, invasão e destruição de tecidos normais, bem como pela elaboração de substâncias que circulam na corrente sanguínea essenciais para diferenciação, proliferação, apoptose, transdução de sinal e inflamação (MANTOVANI, 2004).

Como consequência do avanço da malignidade no tumor, a atrofia dos músculos esqueléticos é um dos principais sintomas que reflete o agravamento da doença e reduzindo a qualidade de vida do paciente (MANTOVANI, 2014)). A caquexia contribui para o aumento da debilidade física, fraqueza, perda da capacidade física, além da depleção de reserva de proteínas que são

usados como substrato para a obtenção de energia para o crescimento tumoral (JULIENNE et al., 2012). Nestas situações, citocinas: TNF $\alpha$ , IL-1 e IL-6 são liberadas pelo tecido lesionado e pelos leucócitos ativados como resultado da estimulação da resposta imune inata (FROST 2005; YEAGLEY & LANG 2010). Os níveis elevados destas estão relacionados à degradação proteica no tecido muscular e conseqüentemente à instalação da fraqueza muscular (KIM et al., 2012).

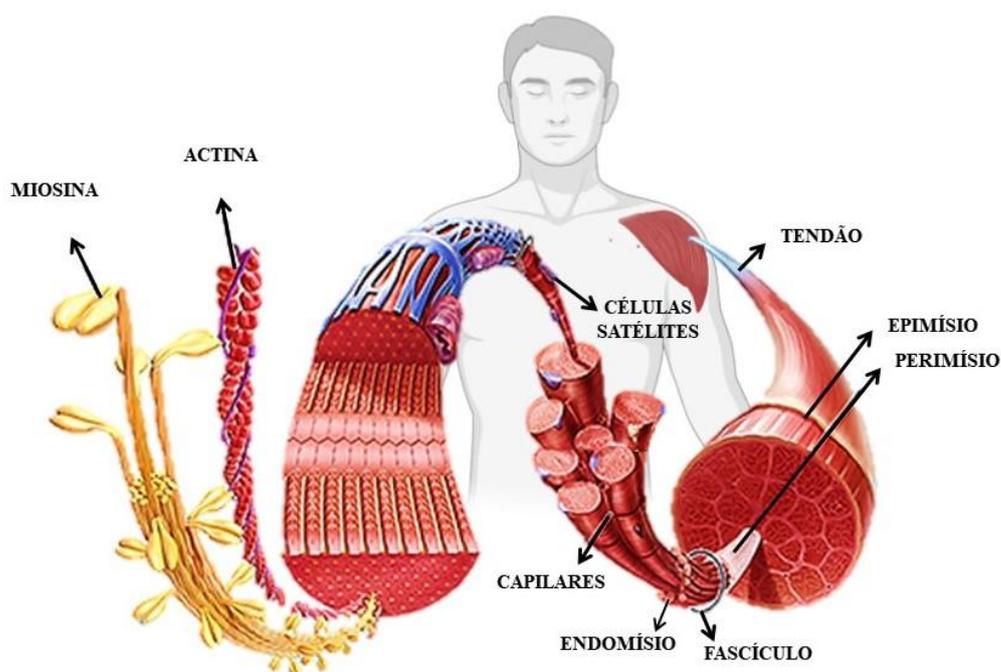
### 2.3 MÚSCULO ESQUELÉTICO

O músculo esquelético é um dos tecidos mais dinâmicos e plásticos do corpo humano, compreendendo cerca de 40% do peso corporal e contendo de 50-75% de todas as proteínas do corpo. No geral, a massa muscular depende do balanço entre os processos de síntese e degradação de proteínas que é regulado por outros fatores como estado nutricional, balanço hormonal, atividade física/exercício e lesões ou doença, entre outros (HOLFE, 2006; HEYMSFIELD et al., 2014).

A principal função do músculo esquelético é transformar energia química em energia mecânica para gerar força necessária para manutenção da postura, e movimento, influenciando não apenas na homeostase, mas na autonomia, ocupação e participação social (HEYMSFIELD et al., 2014). Na perspectiva metabólica, o músculo pode ser considerado como uma reserva de aminoácidos, contribuindo para a manutenção da glicemia em momentos de jejum (gliconeogênese muscular) e na síntese de proteínas órgão-específicas como na pele, cérebro e coração (FRONTERA et al., 2015).

A arquitetura do músculo esquelético é caracterizada com um arranjo bem particular de fibras musculares, associadas ao tecido conjuntivo. O tamanho do músculo é definido pelo número e tamanho das fibras musculares, embora, em condições patológicas, a presença de infiltrado de gordura, tecido conjuntivo e/ou células inflamatórias, possam alterar essa relação de tamanho (JAVAN et al., 2013; FONTIN et al., 2014). Sem considerar a água, uma fibra muscular é constituída aproximadamente por 80% de proteínas e 8% de tecido conjuntivo, sarcoplasma (FRONTERA et al., 2015).

As fibras musculares são multinucleadas, e os núcleos estão posicionados na extensão do sarcoplasma. Assim, o músculo é envolto por um tecido conjuntivo chamado de epimísio. O grupo de fibras no músculo são organizadas em fascículos envolvidas por outra camada de tecido conjuntivo chamada de perimísio; e uma fibra muscular é delimitada por uma membrana celular chamada de endomísio, composta por várias fibras, que contém as miofibrilas que são miofilamentos proteicos de actina e miosina. (Figura 1) (FRONTERA et al., 2015; TROVATO et al., 2016).



**Figura 2:** Estruturas do tecido muscular esquelético (Anatomy & Physiology 3D Plataforma e adaptado pela autora da tese, 2021).

#### 2.4 CAQUEXIA NEOPLASICA

A caquexia é uma síndrome complexa e multifatorial que se caracteriza pela perda de peso, com predominante perda de massa muscular corpórea com ou sem perda de tecido adiposo. Normalmente, a caquexia está presente em algumas doenças em fase terminal, por exemplo:

infecções, AIDS (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida), insuficiência renal crônica, artrite reumatóide, tuberculose e doença pulmonar obstrutiva crônica e principalmente no câncer (MANTOVANI & MADEDDU, 2010). Em pacientes com câncer, a caquexia é considerada o fator mais importante para a morte prematura dos pacientes com tumores de cólon, gástrico e pancreático (YOUNES & NOGUCHI, 2000; TISDALE, 2002).

Em torno de 80% dos pacientes com câncer em estágio avançado desenvolvem caquexia e 20% desses casos vão a óbito (WEYERMANN et al., 2009). Os efeitos da caquexia são severos, prejudicando grandemente a qualidade de vida e diminuindo a resposta terapêutica (BENNANI-BAITI & WALSH, 2010). A perda de massa corporal magra, em particular a musculatura esquelética causada pelo evolução câncer, leva o paciente a fadiga, fraqueza, atrofia muscular e comprometimento de funções vitais, como a respiratória e cardiovascular (MULLIGAN & BLOCH, 1998).

Estudos sugerem que o surgimento da caquexia neoplásica pode ser consequência de diversos fatores ligados a evolução do câncer, como a ingestão diminuída de alimentos, consumo excessivo de nutrientes pelo tecido tumoral, alterações no metabolismo energético do indivíduo, secreção de citocinas tanto pelo sistema imune do hospedeiro, quanto pelas células tumorais, e/ou um somatório desses fatores (TISDALE, 2003; TISDALE, 2005). Desta forma, o catabolismo, como a lipólise e proteólise da massa corpórea promovido pela ação de mediadores inflamatórios induzidos presença do tumor, seria um mecanismo causador da caquexia. (TISDALE, 2009; BATISTA et al., 2012).

As citocinas inflamatórias (IL-1 $\beta$ ), (IL-6) e (TNF- $\alpha$ ) são produzidas pelo próprio tumor, desencadeando uma resposta inflamatória crônica no hospedeiro que colabora para o emagrecimento e desenvolvimento da anorexia, que culminam na síndrome anorexia caquexia (GORDON et al., 2005).

Altos níveis circulantes de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 são encontrados em alguns pacientes oncológicos e se correlacionam com a progressão do tumor (MOLDAWER et al., 1992, NOGUCHI et al., 1996; MATTHYS et al., 1997). A inflamação causa dano tecidual, aumenta a atividade de proliferação celular e desenvolvimento tumoral. Estudos revelam uma forte associação entre condições inflamatórias crônicas e carcinogênese em vários cânceres humanos

(WANG et al., 1998; BALKWILL & MANTOVANI, 2001; COUSSENS & WERB, 2002; PHILIP et al., 2004).

Alguns modelos animais são usados para o estudo e compreensão da caquexia associada ao câncer. Entre eles se destaca o tumor sólido de Ehrlich, uma neoplasia experimental, que simula o desenvolvimento da caquexia tanto na forma de tumor sólido quanto ascítico (VIOLATO et al., 2014; SILVA, SANTOS & CASSALI, 2006).

## 2.5 MODELO ANIMAL PARA ESTUDO DA CAQUEXIA NEOPLÁSICA

O tumor de Ehrlich é uma neoplasia murina originado de um adenocarcinoma mamário, transplantável, espécie específica e que não apresenta antígenos de histocompatibilidade, razão para sua rápida proliferação (DAGLI, 1992). As células ascíticas do tumor, após sua inoculação, aumentam seu volume rapidamente, assim, em poucos dias, o desenvolvimento do tumor causa severa diminuição no peso corpóreo, no peso do fígado, hipertrofia do baço e liberação de citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-18 (KOREANE et al., 2003).

Um estudo do tumor de forma sólida nos membros dos camundongos, observou estado da caquexia a partir do 10º dia de inoculação do tumor e no 14º dia os animais apresentam maior tolerância à glicose, menor concentração plasmática de insulina, bem como maior sensibilidade a este hormônio (VIOLATO et al., 2014).

A resposta anabólica diminuída gera uma perda na síntese de proteína muscular, caracterizando o catabolismo proteico da caquexia com uma reduzida expressão de reguladores positivos miogênico e uma expressão excessiva de reguladores negativos (KUDOU et al., 2017). Com base no conhecimento de que os mionúcleos das fibras musculares maduras são considerados pós-mitóticos (não apresentam capacidade de divisão), a adição de novos mionúcleos são realizadas somente pela atividade das células satélites (CS), que são células precursoras com intensa atividade miogênica. Essas células, proliferam e se diferenciam fornecendo núcleos para a regeneração após uma lesão muscular (CHARGÉ E RUDNICKI 2004).

As células musculares quando formadas são alongadas, por isso são também chamadas fibras musculares. Elas são ricas nos filamentos de actina e de miosina, responsáveis pela sua contração. A actina compõem filamentos de cerca de 7nm de diâmetro, os filamentos finos,

enquanto a miosina II forma filamentos com 15nm de diâmetro, os filamentos espessos. As células do tecido muscular esquelético são originadas da fusão de centenas de células precursoras, os mioblastos, o que as tornam grandes e alongadas, de formato cilíndrico, com um diâmetro de 10 a 100µm e até 30cm de comprimento, e multinucleadas, sendo que os núcleos ficam em posição periférica (JUNQUEIRA, 2013). Os fatores postulados como mediadores da caquexia no câncer podem exercer seus efeitos diretamente sobre o catabolismo do hospedeiro, por exemplo as citocinas, que afetam o metabolismo do hospedeiro indiretamente (TISDALE, 1993). Entre as citocinas, estão o Fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ), a Interleucina-1 e -6 (IL-1 e IL-6), o Interferon gama (INF- $\gamma$ ) e o Fator inibitório de leucemia (LIF) (TISDALE, 1993; TISDALE, 2000). Estas substâncias, liberadas principalmente pelas células do sistema imune, exercem efeitos sobre inúmeras células do organismo (células da medula óssea, miócitos, hepatócitos, adipócitos, células endoteliais e neurônios), onde produzem uma complexa cascata de respostas biológicas, responsáveis pela maioria das alterações metabólicas associadas à caquexia. Desta forma, doses progressivamente altas de TNF- $\alpha$  e IL-6 colaboram para o quadro caquético e perda de tecido muscular esquelético (ARGILÉS., 2005).

## 2.6 RESVERATROL

Na busca de uma alternativa efetiva na modulação da resposta do hospedeiro que proporcione benefícios biológicos e conseqüentemente clínicos, sem causar efeitos colaterais danosos no organismo, aliado a baixo custo, os fitoterápicos passaram a ser investigados. Dentre as substâncias com potencial imunomodulador está o Resveratrol (MUKHERJEE et al., 2010).

O Resveratrol - 3,5,4'-trihidroxi-droxi- estilbeno (RSV) é um fitoalexinapolifenol encontrado em muitas plantas de forma natural e alguns produtos como o vinho tinto e amendoim (SVAJGER & JERAS, 2012; BAUR & SINCLAIR 2006) que apresenta muitos benefícios ao organismo. Este é composto quimicamente por dois anéis fenólicos que são ligados por uma dupla ligação de estireno para gerar a estrutura de estilbeno, que pode existir como um isômero cis ou trans. Conforme Svajger & Jeras (2012), os efeitos farmacológicos de trans-resveratrol, tanto *in vitro* como *in vivo*, têm sido intensivamente estudados e atribuídas maior potencial do que cis-resveratrol.

O RSV é um dos estilbeno naturais mais importantes e tem sido amplamente estudado. Foi demonstrado que a substância possui propriedades de promoção da saúde, dentre as quais destacam-se as atividades antitumoral (WANG et al., 2010), anti-inflamatória (PATEL, et al., 2011), antienvhecimento (SOARES-FILHO, CASTRO e STAHLSCMIDT, 2011).

A literatura sugere que o RSV exerce efeitos fisiológicos em todas as fases da inflamação: desde o início, com o recrutamento de Leucócitos polimorfonucleares (PMN) e sua ativação até a subsequente liberação de mediadores (ORSU et al., 2013, XUZHU et al, 2012).

O RSV atua em receptores de membrana e receptores intracelulares, sinalização de moléculas, enzimas biogénicas (PERVALZ & HOLME 2009), sistema oxidativo, mecanismos de reparação do DNA e fatores de transcrição (ALARCON et al., 2007), incluindo a proliferação celular, diferenciação e até na morte celular (FRANCINE et al, 2009).

No músculo esquelético, o RSV está envolvido na regulação do metabolismo do músculo, catabolismo e função da proteína muscular, e é capaz de conferir resistência contra o estresse oxidativo, lesão e a morte das células do músculo esquelético (ALARCON et al., 2007). Além disso, o RSV tem sido mostrado na melhora da força e resistência do músculo esquelético. Evidências sugerem que o RSV tem um papel ativo na diferenciação músculo esquelético (PERVALZ & HOLME 2009; DIRKS, 2009; KAMINSKI et al., 2012).

Montessano (2013) mostrou que células musculares C2C12 em diferenciação como o RSV foram capazes de promover o processos: 1) induzir a determinação do fenótipo do músculo pela expressão precoce como (Myf-5, MyoD e miogenina), proteínas marcadoras muscular (MyHC) e proteínas estruturais do esqueleto chave ( N-caderina, p120, alfa Actinina); 2) ativando vias de sinalização importantes, incluindo a AKT e MAP quinase; 3) causando alterações morfológicas como alongamento de mioblastos, com o aumento no comprimento, diâmetro, e da tendência de fusão de miócitos em miotubos multinucleados.

Neste contexto, o presente trabalho hipotetiza que os efeitos mioprotetores do RSV podem modular a caquexia induzida pela inflamação associada ao tumor e regular a resposta imune antitumoral, atuando como um potencial adjuvante no tratamento do câncer.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do Resveratrol no tecido muscular após indução *in vivo* da caquexia em modelo de tumor de Ehrlich murinho.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar o peso, consumo alimentar, fibras musculares, área das fibras e glicogênio muscular em camundongos controles e inoculados com tumor sólido de Ehrlich;
- Avaliar o desenvolvimento do tumor sólido em animais tratados com Resveratrol;
- Verificar o efeito do Resveratrol sobre a musculatura esquelética no modelo de caquexia neoplásica.
- Analisar a celularidade de órgãos linfoides em animais tratados com Resveratrol;
- Analisar o perfil das citocinas séricas em animais tratados com Resveratrol;
- Avaliar parâmetros bioquímicos no desenvolvimento do tumor sólido em animais tratados com Resveratrol;

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi realizado no Laboratório de Imunologia Aplicada ao Câncer, em parceria com o Laboratório de Imunofisiologia, Laboratório de Odontologia e Laboratório de Bioquímica da Universidade Federal do Maranhão (UFMA).

### 4.1 ANIMAIS

Os experimentos em animais foram realizados de acordo com os padrões éticos estabelecidos pelo Registro do CEUA: 02/16 com o N° do Protocolo: 23115001364/2016-91. Camundongos Swiss machos (n= 60), com 45 dias de idade foram mantidos em caixas de polipropileno, forradas com maravalha estéril e tampadas com grades inoxidadas. A sala mantinha-se climatizada com temperatura constante de  $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$  e ciclos de claro-escuro de 12h. A adaptação foi feita no biotério setorial no Prédio da Pós-Graduação/ Centro de Ciências Biológicas e da saúde- CCBS/UFMA 15 dias antes do início dos ensaios e inoculação do tumor, diariamente foi realizado o controle de consumo de ração e peso dos animais, além de mensuração do volume do tumor com paquímetro digital. O estudo experimental começou quando os camundongos atingiram 60 dias, uma vez que nesta idade já apresentam peso e musculatura estriada esquelética definida (VIOLATO et al, 2014).

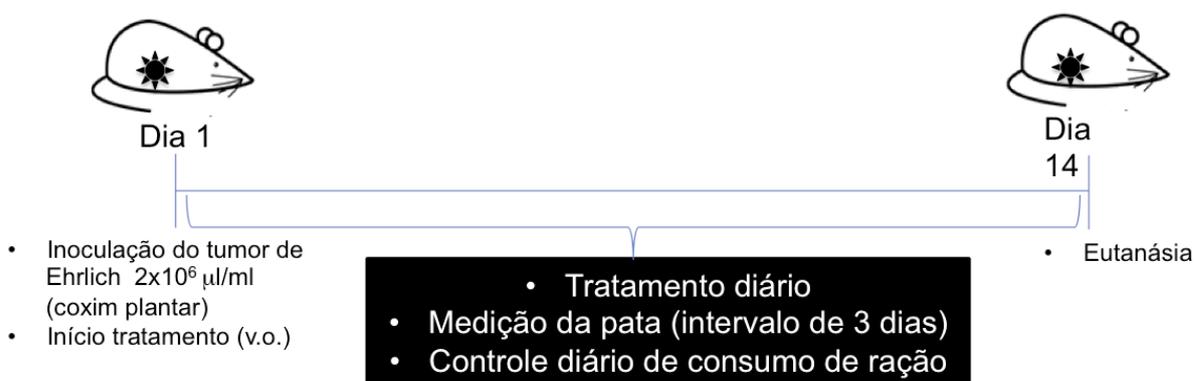
### 4.2 MANUTENÇÃO DO TUMOR ASCÍTICO DE EHRLICH

As células do Tumor de Ehrlich foram mantidas na forma ascítico em camundongos da linhagem Swiss por uma semana (7 dias). Após esse intervalo, o volume de 200 $\mu\text{l}$  do líquido ascítico do peritônio foi retirado de camundongos doadores e a viabilidade das células tumorais determinadas através da contagem por exclusão do corante azul-tripán em câmara de Neubauer (NASCIMENTO et al., 2006; REIS et al., 2012; FORTES, 2009; SERRA, 2016; NASCIMENTO, 2018).

### 4.3 DESENHO EXPERIMENTAL

Os animais, com 60 dias de vida, foram submetidos a inoculação do tumor de Ehrlich  $2 \times 10^6 \mu\text{l/ml}$  no coxim do membro posterior direito, em seguida, foram tratados por 14 dias (Figura 3). O Resveratrol foi administrado por gavagem no volume de 0,5ml de solução de

Resveratrol na concentração (10mg/kg) (R5010-500MG - Sigma-Aldrich Brasil Ltda.) diariamente (CASATI et al, 2013) e ciclofosfamida por injeção intraperitoneal 50 $\mu$ L na concentração de 25 mg/Kg (BHATTACHARJEE et al., 2017). O tratamento foi realizado diariamente por 14 dias e os grupos foram divididos conforme a Tabela 1. Ao final do experimento os animais foram eutanasiados com uma superdose de anestésico (Ketamina 30mg/kg e Xilasina 300mg/Kg) e as carcaças destinadas ao descarte conforme as orientações do Biotério Central da UFMA.



**Figura 3.** Esquema experimental.

Tabela 1: Grupos experimentais do ensaio *in vivo*:

Sem inoculação do tumor	<p><b>Normal:</b> Animais sadios sem inoculação do tumor e sem tratamento.</p> <p><b>Resveratrol (RSV):</b> Animais sadios tratados com Resveratrol na concentração de 10mg/kg.</p>
Inoculados com tumor	<p><b>Controle negativo (CTL-):</b> Animais com tumor sem tratamento.</p> <p><b>Controle positivo (CTL+):</b> Animais tratados com ciclofosfamida na concentração de 25mg/kg, por via intraperitoneal.</p> <p><b>Resveratrol (RSV):</b> Animais tratados com Resveratrol na concentração de 10mg/kg, através de gavagem.</p> <p><b>Ciclofosfamida e Resveratrol (RSV+CP):</b> Animais tratados com Ciclofosfamida (25mg/kg) por via intraperitoneal e Resveratrol (10mg/kg) por gavagem.</p>

Durante todo o tratamento a cada 24 horas foi realizado controle de ração das gaiolas e os animais foram pesados. Após a eutanásia, as patas, o tecido muscular e os órgãos linfoides foram dissecados, pesados e avaliados através da contagem das células do baço, medula óssea e linfonodos.

#### 4.4 PREPARO DAS CÉLULAS PARA INOCULAÇÃO

No dia da inoculação a ascite foi coletada dos animais usados para a manutenção do tumor e centrifugada por 10 minutos a 1.200 rpm/min a temperatura de 18°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de células foi ressuspenso em Solução Tamponada de Fosfato (PBS). A lavagem foi repetida mais duas vezes ou até a obtenção de um sobrenadante límpido. Para ajuste da concentração, as células tumorais foram ressuspenso em 10mL de PBS, retirada uma alíquota

10µl, adicionada 10µl do corante azul de Tripan 0,4% e contadas em câmara de Neubauer com auxílio de microscópio ótico, considerando as células viáveis as que não estavam coradas em azul e as inviáveis as células coradas em azul.

Para o experimento foi considerado para inoculação a viabilidade mínima de 90%. Para o inoculo foram utilizados 50µL da suspensão celular na concentração de  $2 \times 10^7$  células/ml que foram administradas no coxim plantar do membro posterior esquerdo para obtenção do tumor na forma sólida (DAGLI,1992, VIOLATO et al., 2014).

#### 4.5 AVALIAÇÃO DO TUMOR

O crescimento do volume tumoral foi acompanhado por meio paquímetro digital Vonder® após o terceiro dia de tratamento, o tumor se tornou mensurável em todos os animais dos grupos inoculados, até o décimo quarto dia (Eutanásia). Para calcular o volume tumoral ( $\text{mm}^3$ ) foi utilizada a seguinte fórmula:

Volume do tumor ( $\text{mm}^3$ ) = (LxWxH), onde, o comprimento (L) foi multiplicado pela largura (W) e pela altura (H) (POSADA, 2004).

Após a eutanásia, o membro foi seccionado na articulação do tornozelo e os 30 membros (5 por grupo) foram pesados, sendo o controle como referência sem tumor e os demais grupos com o tumor e seus tratamentos, após a secção, imediatamente os membros foram pesados em balança semi-analítica (Balança Semi-Analítica Bel 0,001g, 210g S203H) (ARAÚJO, 2009).

#### 4.6 AVALIAÇÃO DO TECIDO MUSCULAR

Após o período experimental, foi realizada a eutanásia dos animais e o músculo gastrocnêmio, 30 músculos (5 por grupo) foram para análise do peso úmido e peso seco, para a obtenção do índice de hidratação e do peso seco, imediatamente após a retirada do músculo, o mesmo foi pesado em balança semi-analítica e em seguida colocado em uma estufa a 60°C. Subsequentemente, o músculo foi pesado após 24 horas até permanecer com peso constante (em mg). Assim, pela diferença entre o peso inicial (peso úmido) e o peso final, foi determinado o peso seco (em mg) pela (Balança Semi-Analítica Bel 0,001g, 210g S203H) (KIM., 2007).

Para análise histológica, 30 músculos (5por grupo) foram seccionado transversalmente no terço médio de seu ventre, posicionado em bloco de madeira e conservados em formaldeído. Os músculos foram corados em Hematoxilina por 15 minutos e Eosina por 3 minutos (PETTE, 2000).

Os cortes transversais das fibras musculares foram foto registradas com auxílio do microscópio óptico invertido Nikon®, no modelo do programa NIS- *Elements advanced research* na objetiva de aumento de 200x definida em quatro campos (Superior e inferior, direito e esquerdo) e as imagens foram adquiridas com medida de referência em 200µm. Para análise das fibras musculares, as imagens foram avaliadas utilizando o *software Image J*. Inicialmente, as imagens foram divididas em quadrante para melhor delimitação manual das fibras, com aumento de 50x. Em seguida foi realizada a calibração da imagem em mm e a conversão da imagem (Image-> Type ->8bit) para os tons de cinza, retirando os ruídos da imagem, e a correção de brilho e cor (Adjust- Brightness/contraste, mínimo 86 e máximo 166)(VENTER & NIESLER 2020) (Figura 4). O valor do número de fibras por campo e a área das fibras foram comparados entre os grupos para análise estatística.

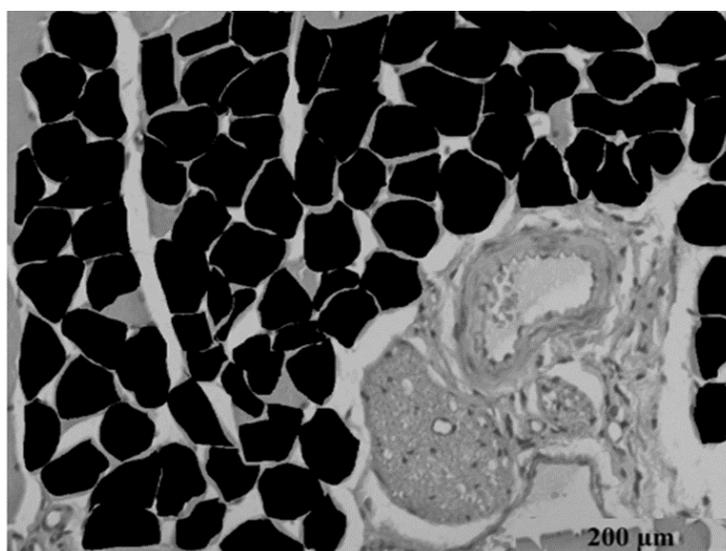


Figura 4. Imagem histológica transversal do musculo após a calibração da imagem para análise no *software Image J*.

Para a determinação do glicogênio, as amostras dos músculos foram digeridas em KOH 30% a 100°C e o glicogênio precipitado a partir da passagem por etanol em alta temperatura. Entre

uma fase e outra da precipitação, a amostra foi centrifugada a 3.000 rpm durante 10 minutos. O glicogênio precipitado foi submetido à hidrólise ácida na presença de fenol, segundo a proposta de SIU et al. 1970, estando os valores expressos em mg/100mg de peso úmido (SIU et al, 1970).

#### 4.7 AVALIAÇÃO DOS ÓRGÃOS LINFOIDES

Os linfonodos poplíteos das patas esquerdas foram retirados, pesados e triturados em 1 mL de PBS e as suspensões celulares diluídas 100x em PBS para a realização das contagens. Os baços foram retirados, pesados e triturados em 5 mL de PBS e as suspensões celulares foram mantidas em banho de gelo e diluídas 50x em PBS para contagem. Para obtenção das células da medula óssea, o fêmur do membro esquerdo que não tinha tumor, foi perfundido com 1 mL de PBS. Foram retirados 90 µL das suspensões celulares obtidas dos respectivos órgãos. As células foram fixadas e coradas em 10 µL de cristal violeta (0,05%) dissolvido em ácido acético 30%. As contagens celulares foram realizadas em câmara de Neubauer, com auxílio de microscópio óptico de luz comum (ARAÚJO et al, 2010).

#### 4.8 DOSAGEM DE CITOCINAS PLASMÁTICAS

Após a obtenção do plasma, como descrito anteriormente, os níveis de IL-6, TNF- $\alpha$ , sFasL e MIP-1a, no plasma foram determinados por meio da tecnologia *Luminex/MAGpix*, a qual permite determinar a presença e quantificar de forma absoluta a concentração de diferentes marcadores em uma mesma amostra. Para tanto, as análises foram realizadas em placas de 96 poços, com o auxílio de painéis de alta sensibilidade *RCYTOMAG-80K* (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA), seguindo as instruções do fabricante.

#### 4.9 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

Os animais foram anestesiados com Xilasina e Ketamina e a coleta de sangue foi realizada por punção pelo plexo retro orbital, obtendo aproximadamente 800µl de sangue total/animal. As amostras foram acondicionadas em microtubos com anticoagulante EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) na concentração de 10 g/dL. O plasma foi separado por processo de centrifugação (EPPENDORF, 5804) a 2.500 rpm/minuto por 10 minutos, obtendo-se plasma livre de hemólise. Os processos das análises bioquímicas constaram das dosagens de: LDH e TGO e TGP. Os ensaios foram realizados por sistema de identificação-espectrofotométrica em

analisador bioquímico semi-automatizado (*COBAS MIRA-ROCHE DIAGNOSTIC SYSTEM*), com utilização de Kits comerciais *Bioclin /Biosystems e Labtest* (DANTAS et al., 2006).

#### 4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

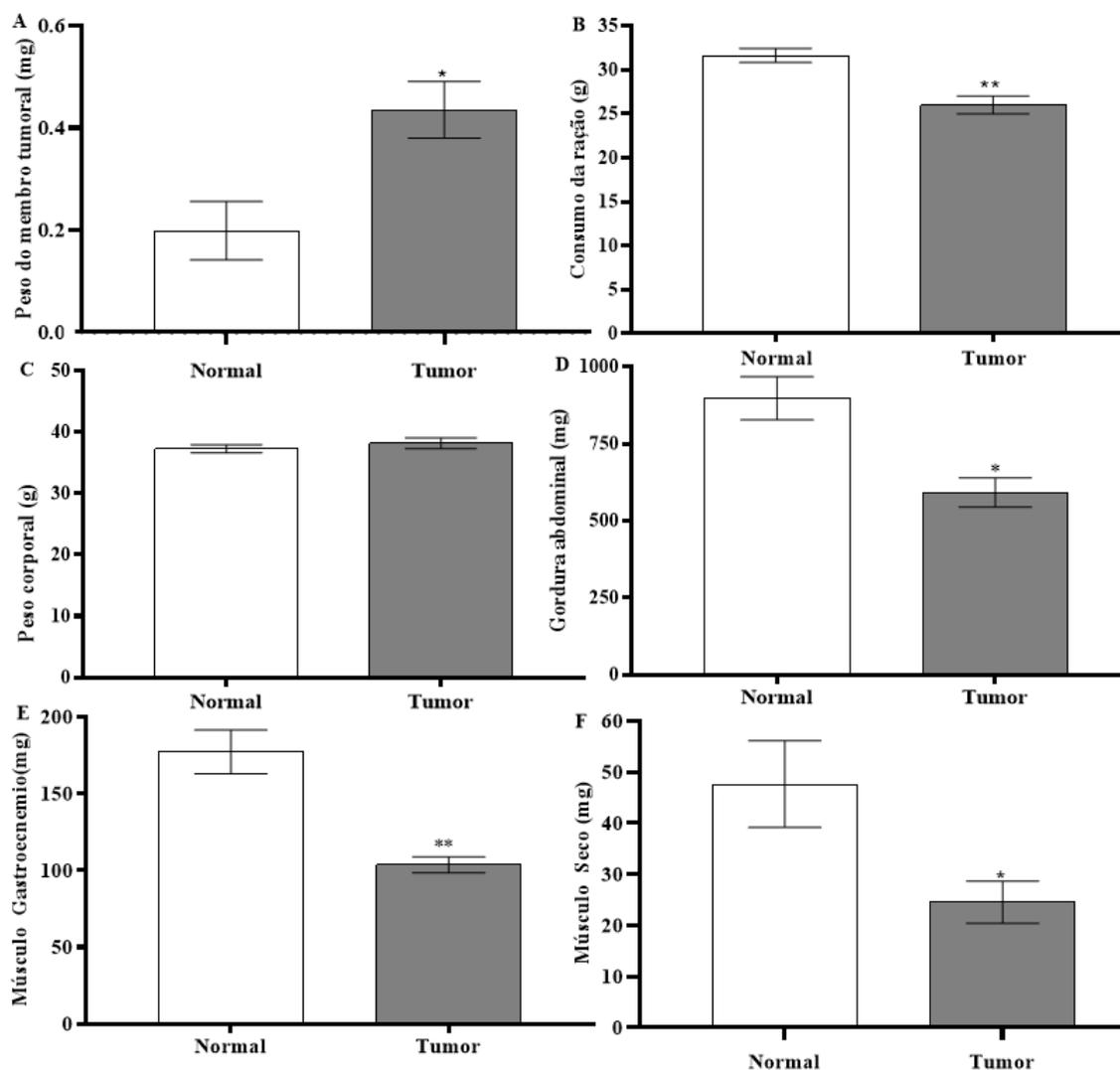
Os dados foram tabulados em Excel. Foi verificado a normalidade da distribuição dos dados. Para comparação entre os Grupos Normais e Controle negativo (inoculado com tumor sem tratamento) foi utilizado o t Teste não pareado ou *Mann-Whitney*. Para os grupos inoculados com tumor que foram tratados foi aplicado o teste ANOVA com pós-teste *Kruskall Wallis*, de acordo com avaliação de normalidade. Para todos os testes estatísticos foi considerado significativo o ( $p < 0.05$ ). Os dados foram analisados pelo software *GraphPad Prism* (La Jolla, CA, EUA) e expressos como média  $\pm$  erro padrão da média.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 MODELO EXPERIMENTAL DA CAQUEXIA NEOPLÁSICA

Para verificar se o modelo de tumor sólido de Ehrlich seria capaz de induzir a caquexia, foi avaliado o peso do membro com tumor, o consumo alimentar, gordura intraperitoneal, peso corporal e o tecido muscular dos animais.

O grupo dos animais inoculados com tumor mostraram aumento no membro posterior direito ( $0,43\text{mg}\pm 0,05$ ) em relação ao membro posterior direito dos animais do grupo normal ( $0,21\text{mg}\pm 0,028$ ) (Figura 5A), indicando o estabelecimento da neoplasia. Em seguida, foi observado que o grupo inoculado com tumor de Ehrlich apresentou menor consumo alimentar ( $26,01\text{g}\pm 3,7$ ) comparado com o grupo sem tumor ( $31,63\text{g}\pm 3$ ) (Figura 5B). Na avaliação do peso da gordura intraperitoneal (Figura 5C) o grupo com tumor apresentou diminuição ( $591,8\pm 149,3$ ) em comparação ao normal ( $897,4\text{mg}\pm 221,75$ ), por outro lado, o peso corporal (Figura 5D) não mostrou diferença estatística entre os grupos (tumor  $38,16\text{g}\pm 0,8767$  vs Normal  $37,3\text{g}\pm 0,65$ ). Um dado relevante para o modelo foi a perda significativa do músculo esquelético dos camundongos portadores de tumor (Figura 5 E e F), tanto no peso úmido, como no seco respectivamente, grupo tumoral peso: ( $103,7\text{mg}\pm 16,71$  úmido e  $23,2\text{mg}\pm 5,3$  seco) quando comparados com o grupo normal ( $177,3\text{mg}\pm 43$  úmido e  $48,15\text{mg}\pm 9,3$  seco), mostrando uma perda de massa muscular isolada e, conseqüentemente, um estado caquético.

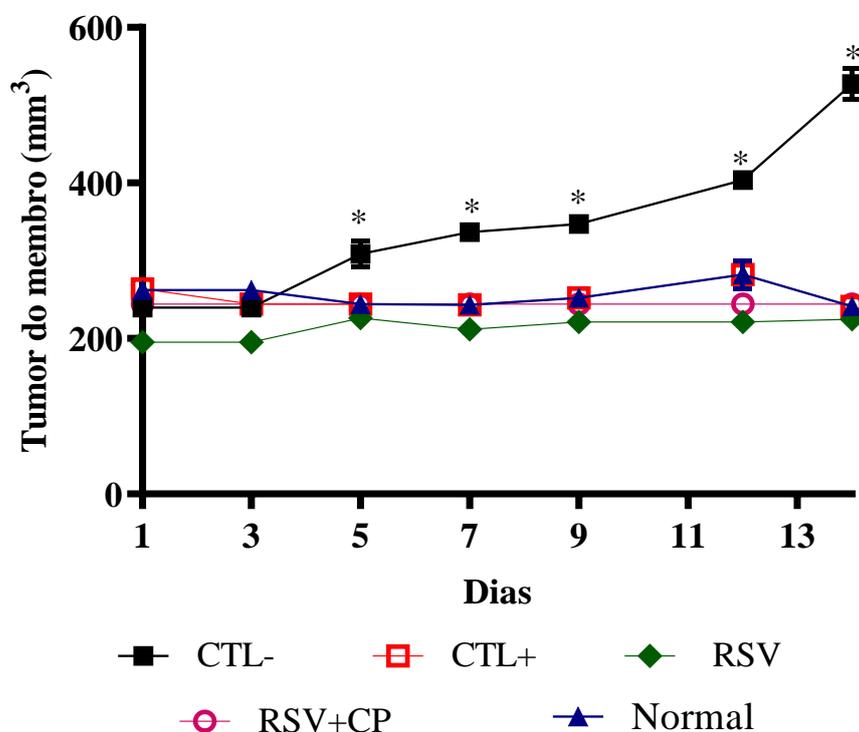


**Figura 5.** Efeito da inoculação do tumor sólido de Ehrlich no peso do membro com tumor, consumo alimentar, peso da gordura intraperitoneal, peso corporal e peso do músculo (úmido e seco) no modelo de caquexia. Peso do membro inoculada dos camundongos controle e portadores de tumores após a eutanásia no 15º dia (A), representando o crescimento do tumor. A ingestão de alimentos pelos camundongos controle e portadores do tumor de Ehrlich no decorrer dos 14 dias (B). Peso da gordura intraperitoneal dos camundongos controle e portadores de tumores após a eutanásia (C). Peso corporal dos camundongos controle e portadores de tumores por 14 dias (D). Peso do músculo úmido/seco em camundongos controle e portadores de tumores após a eutanásia (E e F). Os gráficos de barra representam a média  $\pm$  desvio padrão com valor de  $p < 0.0001$  pelo teste T-Student.

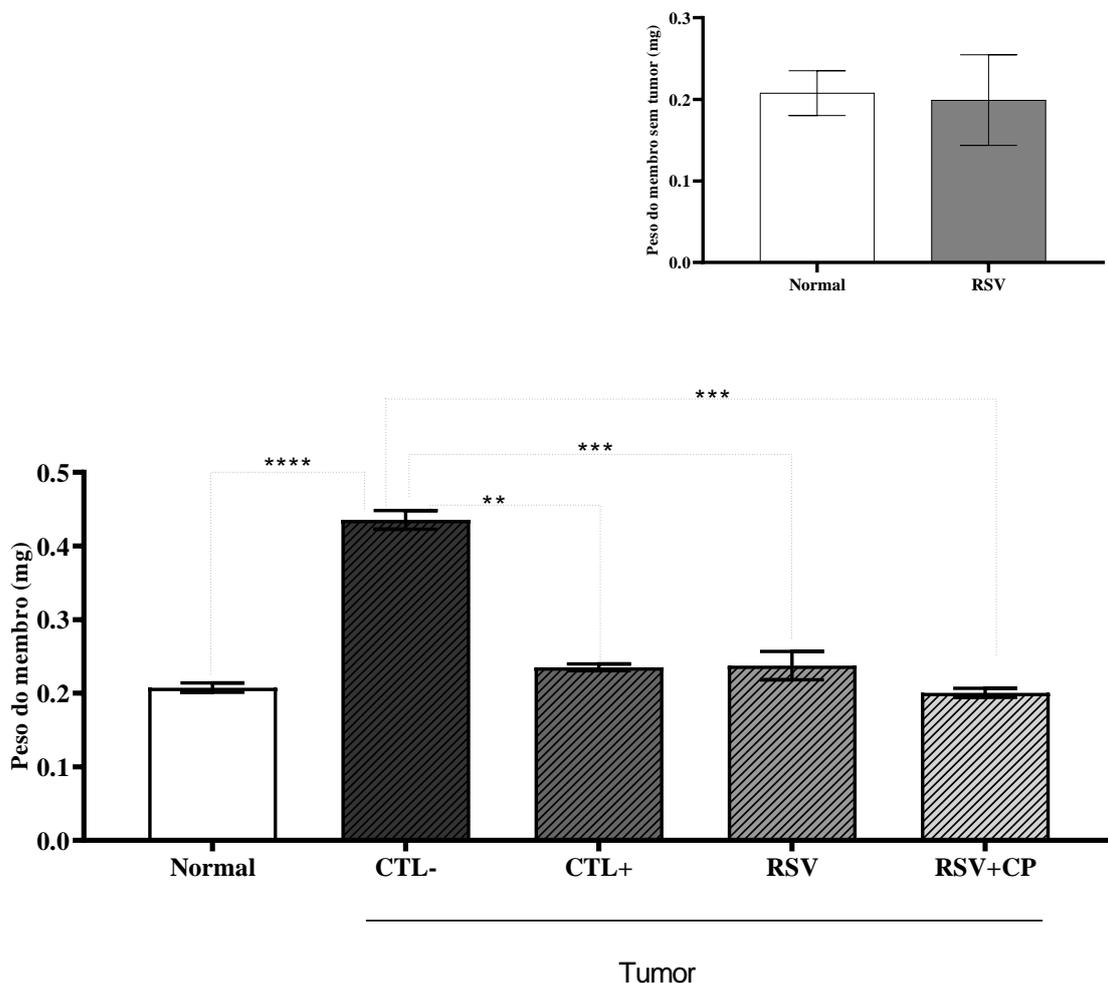
## 5.2 O RESVERATROL REDUZ O DESENVOLVIMENTO DO TUMOR SÓLIDO DE EHRLICH.

Para avaliar o efeito do Resveratrol no crescimento do tumor. O volume do membro inoculada foi aferido ao longo dos 14 dias de tratamento. Os resultados na figura 6 mostram que a partir do 5º dia, o grupo sem tratamento (CTL-) mostrou um aumento do volume, seguindo esse comportamento ascendente até o 14º dia ( $343,3\text{mm}^3 \pm 100,1$ ). O grupo tratado com ciclofosfamida (CTL+) apresentou uma redução significativa do volume após o 14º dia ( $253,1\text{mm}^3 \pm 3,11$ ), sugerindo que o tratamento foi eficaz em conter o crescimento do tumor. Da mesma forma, o tratamento do animal inoculado com Resveratrol (RSV) também se mostrou eficaz com redução no volume do membro inoculada com tumor ( $213,7\text{mm}^3 \pm 13,46$ ), bem como o tratamento associado do Resveratrol e Ciclofosfamida (RSV+CP) ( $244,4\text{mm}^3 \pm 0$ ) (Figura 6).

Os resultados mostraram que o grupo normal ( $0,20 \pm 0,02$ ) apresentou um menor peso do membro em comparação com o grupo com tumor sem tratamento ( $0,43\text{mg} \pm 0,05$ ) e um maior valor do peso do membro do animal inoculado com tumor sem tratamento ( $0,43\text{mg} \pm 0,05$ ) em relação aos grupos tratados: com Ciclofosfamida ( $0,23\text{mg} \pm 0,01$ ), RSV com tumor ( $0,23\text{mg} \pm 0,08$ ) bem como o tratamento associado do RSV e Ciclofosfamida ( $0,20\text{mg} \pm 0,02$ ) (Figura 7). Como um dado suplementar, a comparação entre os animais que não foram inoculados com tumor do grupo Normal ( $0,20 \pm 0,02$ ) e do grupo tratado Rsv ( $0,19 \pm 0,05$ ) não apresentaram alteração no peso do membro posterior (Figura 7s).



**Figura 6. Cinética do volume no membro inoculada com tumor.** O gráfico de linha representa os pontos médios no desenvolvimento do volume do membro com o tumor sólido de Ehrlich comparando o grupo sem tratamento (CTL-: controle negativo), tratado com ciclofosfamida (CTL+: controle positivo), tratado com Resveratrol (RSV) e tratado com a associação da Ciclofosfamida e Resveratrol (RSV+CP). Os grupos (n=10) foram comparados entre si, em cada tempo. O gráfico de linha representa a média  $\pm$  desvio padrão, \* significa o valor de  $p < 0.0001$  do grupo controle negativo comparado aos demais grupos pelo teste ANOVA seguido de pós teste Kruskal-Wallis.



**Figura 7. Efeito do Resveratrol no peso do membro inoculado com tumor.** O gráfico barra representa o peso médio do grupo normal e do membro com o tumor sólido de Ehrlich comparando o grupo com tratamento (CTL-: controle negativo), tratado com ciclofosfamida (CTL+: controle positivo), tratado com Resveratrol (RSV) e tratado com a associação da Ciclofosfamida e Resveratrol (RSV+CP). O gráfico suplementar (figura 6s) representa o grupo sem tumor (Normal) e o grupo tratado com Resveratrol sem tumor (RSV). Para a comparação entre o Grupo Normal e Controle negativo foi aplicado o teste t não pareado com o valor de \*\*\*\* $p < 0.0001$ . Os demais grupos (n=10) foram comparados entre si através da média  $\pm$  desvio padrão com \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.0001$  pelo teste ANOVA seguido de pós teste Kruskal-Wallis.

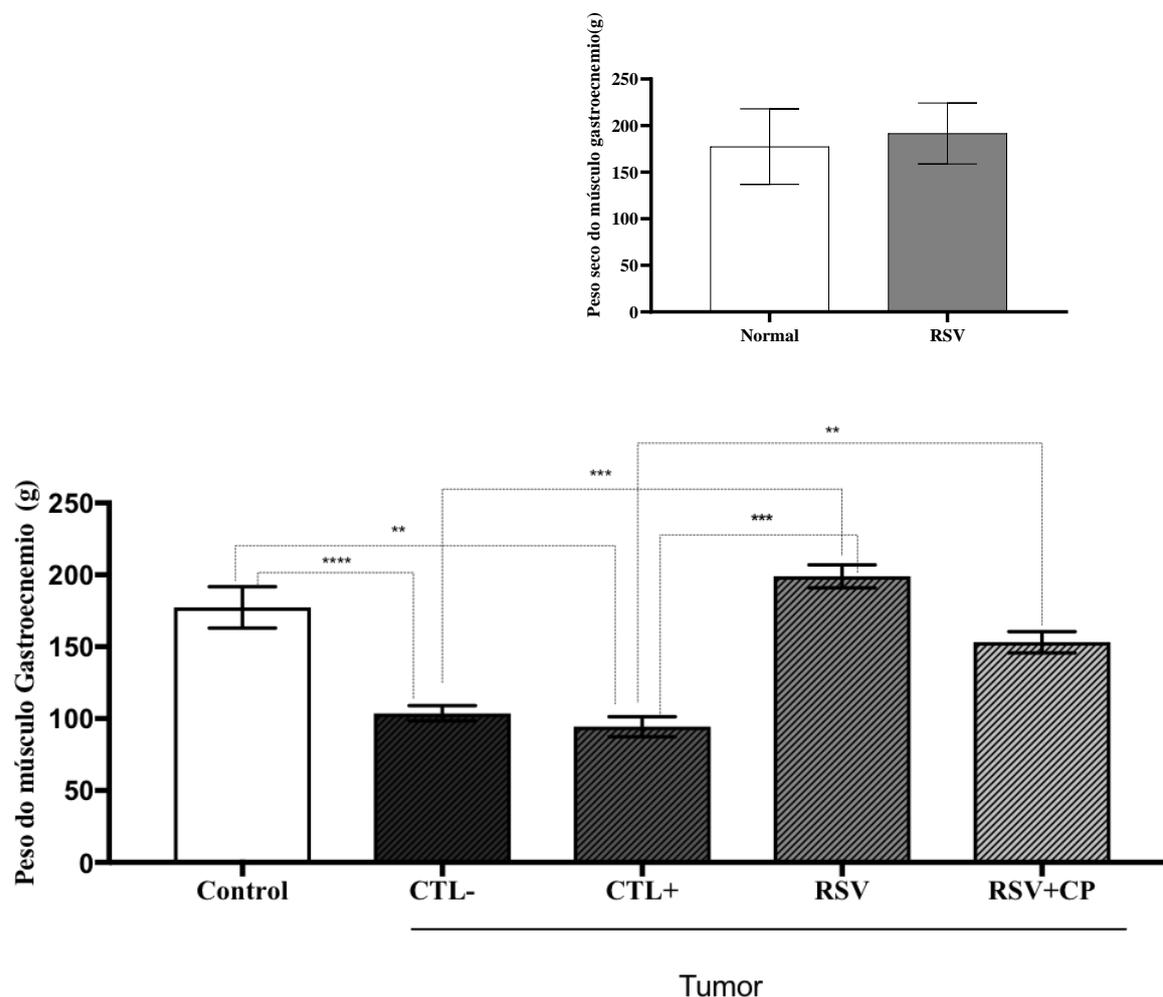
### 5.3 RSV NA MANUTENÇÃO DO MÚSCULO ESTRIADO ESQUELÉTICO NO MODELO DE CAQUEXIA COM TUMOR DE EHRLICH

Após a análise do efeito do Resveratrol no desenvolvimento do tumor, seguiu-se o estudo para verificar seus efeitos na caquexia neoplásica avaliando o peso do músculo esquelético.

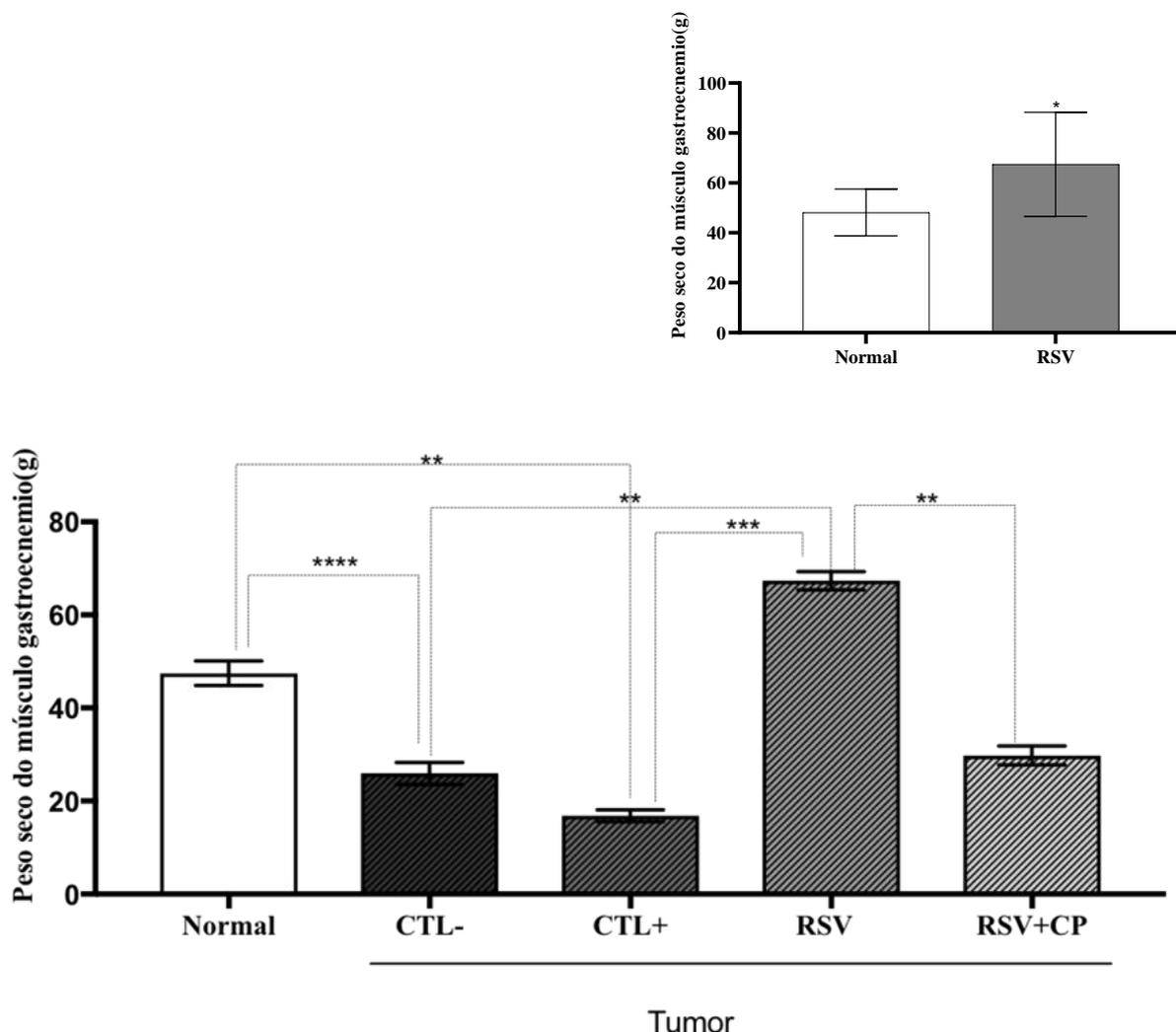
O peso úmido do músculo gastrocnêmio apresentou uma redução significativa no grupo controle negativo ( $103,7\text{mg}\pm 16,71$ ) e no grupo controle positivo ( $94,39\text{mg}\pm 21,99$ ) quando comparado ao grupo sem tumor ( $177,3\text{mg}\pm 43$ ), representando uma perda aproximada de 40% do peso. O grupo controle negativo também mostrou uma perda em relação ao grupo dos animais com tumor tratado com RSV ( $199\text{mg}\pm 25,14$ ). O grupo com tumor que recebeu o tratamento associado, RSV e Ciclofosfamida ( $153,2\text{mg}\pm 23,26$ ) mostrou peso médio do músculo maior que o controle positivo, tratado apenas com ciclofosfamida (Figura 8).

O gráfico suplementar mostra os grupos sem tumor indicando que o tratamento com RSV, por si, não mostrou diferença do peso muscular úmido em relação ao grupo normal, (Normal:  $177,3\text{mg}\pm 43$  vs RSV:  $191,5\text{mg}\pm 32,72$ ) (Figura 8s).

Para melhor avaliar a massa proteica muscular, foi determinado o peso seco do gastrocnêmio. Os resultados foram semelhantes ao peso úmido, havendo uma redução no peso seco nos grupos com tumor sem tratamento ( $23,2\text{mg}\pm 5,325$ ) e no grupo tratado com Ciclofosfamida ( $16,82\text{mg}\pm 4,06$ ), quando comparado ao grupo normal ( $48,15\text{mg}\pm 9,36$ ). Por outro lado, o grupo com tumor tratado com RSV mostrou um peso muscular seco ( $67,34\text{mg}\pm 6,26$ ) significativamente maior em comparação com todos os grupos inoculados com tumor. O tratamento com RSV associado com a Ciclofosfamida ( $29,78\text{mg}\pm 6,45$ ) teve uma melhora no peso comparado ao grupo tratado com ciclofosfamida, mas sem significância (Figura 9). Na figura suplementar, os dados mostram que o tratamento com RSV ( $67,44\text{mg}\pm 20,82$ ) não alterou o peso seco do músculo em relação ao controle ( $48,15\text{mg}\pm 9,36$ ) (Figura 9s).



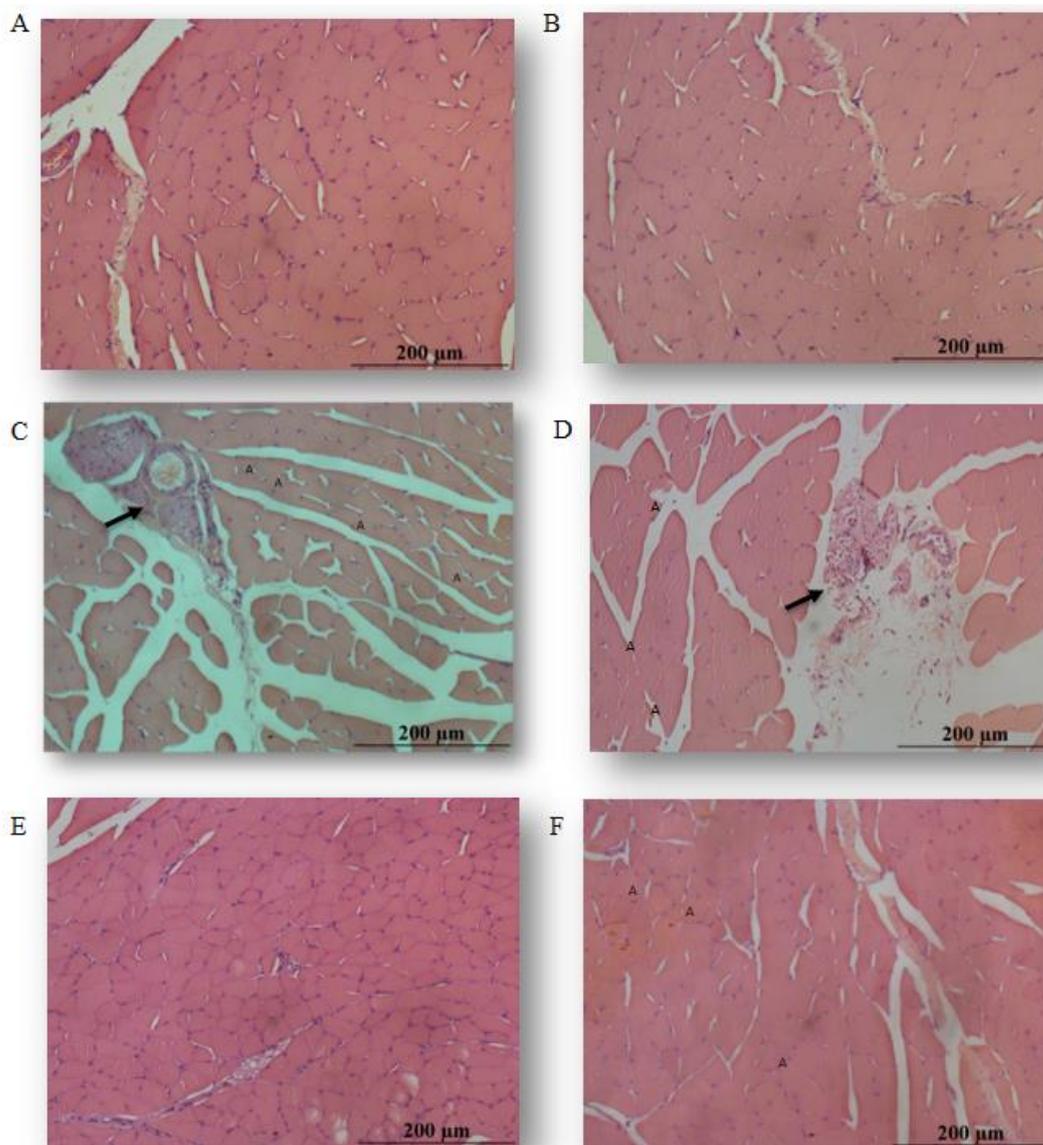
**Figura 8. Peso úmido do músculo estriado esquelético no modelo de caquexia com tumor sólido de Ehrlich.** O gráfico barra representa o peso médio do músculo úmido do grupo sem tumor e sem tratamento (Normal) e dos animais com o tumor sólido de Ehrlich comparando o grupo com tratamento (CTL-: controle negativo), tratado com ciclofosfamida (CTL+: controle positivo), tratado com Resveratrol (RSV) e tratado com a associação da Ciclofosfamida e Resveratrol (RSV+CP). O gráfico suplementar (7s) representa o grupo sem tumor (Normal) e o grupo tratado com Resveratrol (RSV). Para a comparação entre o Grupo Normal e Controle negativo foi aplicado o teste Mann-Whitney com o valor de \*\*\*\* $p < 0.0001$ . Os demais grupos (grupos (n=5) foram comparados entre si através da média  $\pm$  desvio padrão com \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  e \*\*\* $p < 0.0001$  pelo teste ANOVA seguido de pós teste Kruskal-Wallis.



**Figura 9. Peso seco do músculo estriado esquelético no modelo de caquexia com tumor sólido de Ehrlich** O gráfico barra representa o peso médio do músculo seco do grupo sem tumor e sem tratamento (Normal) e dos animais com o tumor sólido de Ehrlich comparando o grupo com tratamento (CTL-: controle negativo), tratado com ciclofosfamida (CTL+: controle positivo), tratado com Resveratrol (RSV) e tratado com a associação da Ciclofosfamida e Resveratrol (RSV+CP). O gráfico suplementar (7s) representa o grupo sem tumor (Normal) e o grupo tratado com Resveratrol (RSV). Para a comparação entre o Grupo Normal e Controle negativo foi aplicado o teste t não pareado com o valor de \*\*\*\* $p < 0.0001$ . Os demais grupos ( $n=5$ ) foram comparados entre si através da média  $\pm$  desvio padrão com \*\* $p < 0.01$  e \*\*\* $p < 0.0001$  pelo teste ANOVA seguido de pós teste Kruskal-Wallis.

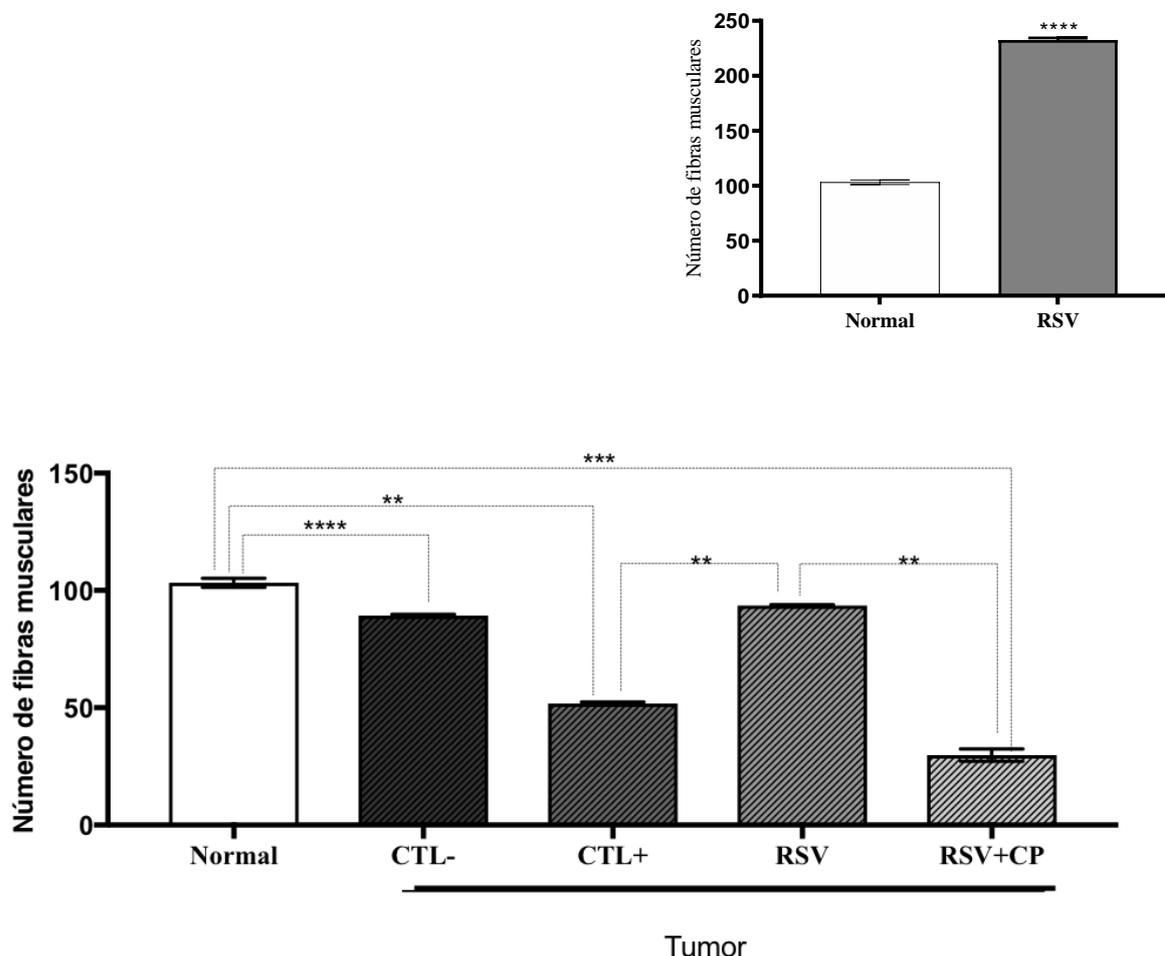
Seguindo a avaliação do tratamento no tecido muscular, foram realizadas as análises qualitativa e quantitativa das fibras musculares.

A avaliação morfológica das fibras musculares obtidas dos animais sem tumor apresentou uma aparência normal com tamanho, contornos poligonais e sarcoplasma bem definido (Figura 10 A), da mesma forma que o tratamento com o RSV, preservando os parâmetros morfológicos (Figura 10 B) e sugerindo não alterar a morfologia da musculatura. No entanto, no contexto do tumor, foi observado que o músculo gastrocnêmio nos grupos: controle negativo (figura 10C) e controle positivo (figura 10D) apresentaram o endomísio espessado, sugestivo de edema, afastamento das fibras musculares, reação inflamatória, aumento do número de núcleos, fagocitose com perda de fibras musculares e polimorfismo de fibras. Na avaliação do tratamento com RSV (Figura 10E) foi observado a manutenção da musculatura esquelética como descrito para o animal saudável. Entretanto o tratamento associado do RSV e ciclofosfamida (Figura 10F) mostrou perda da característica muscular, sugerindo que o RSV não impediu a degeneração muscular causada pela ciclofosfamida.



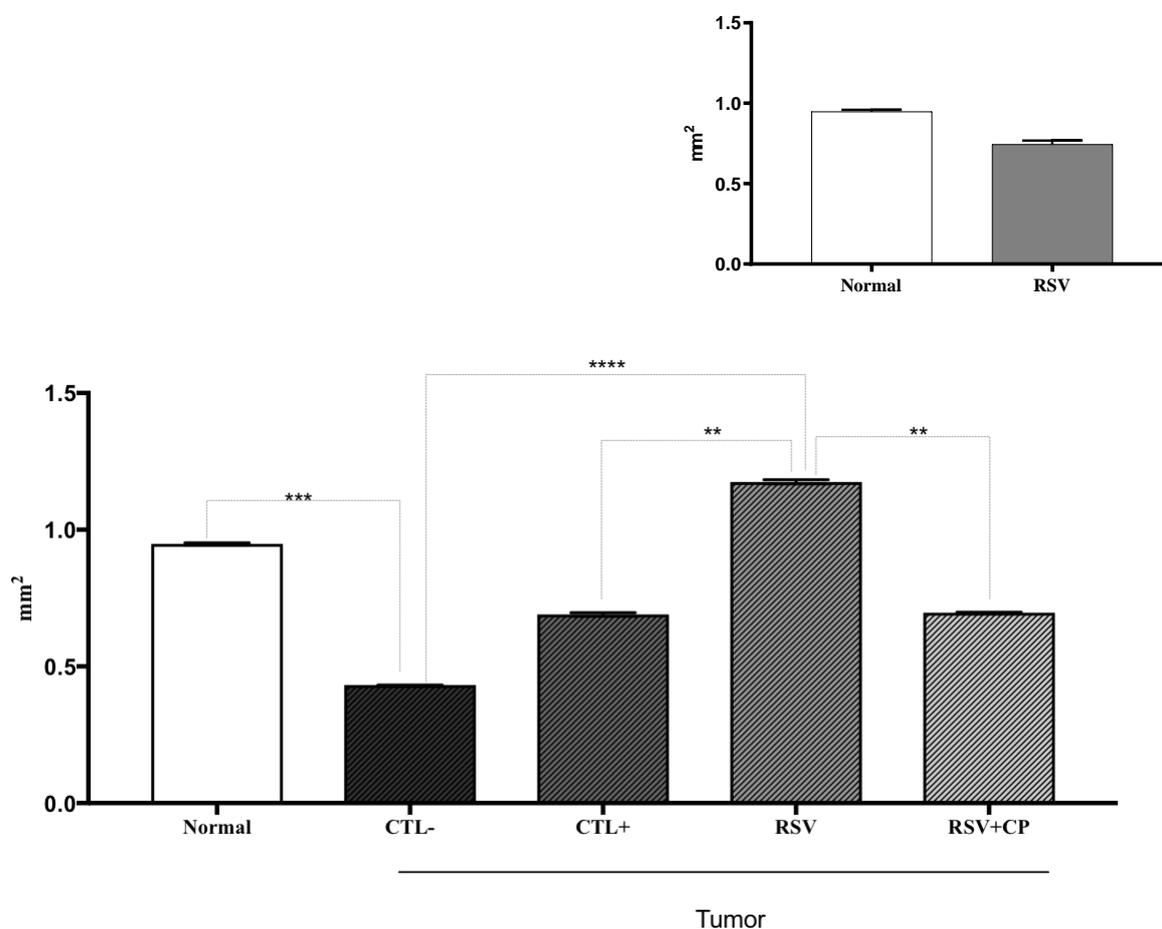
**Figura 10. Micrografia do corte transversal do músculo gastrocnêmio.** O músculo gastrocnêmio do grupo normal (10A) e tratados com RSV sem tumor (9B) apresentaram fibras com aspectos normais e endomísio normal. Nos grupos inoculados com tumor de Ehrlich foi observado que os Grupos controle negativo, sem tratamento (10C), e controle positivo, tratado com ciclofosfamida (10D), mostraram o endomísio espessado, sugestivo de edema, afastamento de fibras musculares, reação inflamatória (Seta) e polimorfismo de fibras (letra A). Os grupos inoculados com tumor tratado com RSV (10E) apresenta uma arquitetura muscular normal e tratado com Resveratrol e ciclofosfamida (10F) mostraram alterações sugestivas de inflamação (Seta) e polimorfismo de fibras (letra A). HE 200x / Barra = 200 µm.

Avaliando o número de fibras musculares no modelo de caquexia neoplásica, os animais com tumor (CTL-) ( $89,25 \pm 1,5$ ) apresentaram uma redução no número de fibras quando comparado com o grupo normal ( $103,5,3 \pm 1,9$ ). Os animais com tumor e tratados com Ciclofosfamida ( $51,75 \pm 2,0$ ) apresentaram uma redução ainda maior no número de fibras, comparado tanto com o grupo normal como o controle negativo. O grupo com tumor tratado com RSV ( $93,5 \pm 1,19$ ) apresentou um maior número de fibras comparado ao controle positivo, mas não diferindo do controle negativo. Por outro lado, o tratamento associado do RSV e Ciclofosfamida ( $37,5 \pm 0,5$ ) mostrou o menor valor médio de número de fibras, se diferindo do grupo RSV (Figura 11). Na condição sem a indução do tumor, o grupo dos animais sem tumor tratados com RSV apresentou uma significativa elevação no número médio de fibras ( $232,5 \pm 1,9$ ) em comparação com os animais normais ( $103,5,3 \pm 1,9$ ) (figura 11s).



**Figura 11. Número das fibras do músculo gastrocnêmio por unidade de área obtidas de camundongos no modelo de caquexia com tumor sólido de Ehrlich (HE 200x).** O gráfico barra representa o número das fibras do músculo determinadas com auxílio do *software Image J*. As imagens de corte transversal do músculo dos grupos: sem tumor e sem tratamento (Normal); Controle negativo (CTL-) inoculado com tumor, sem tratamento; Controle positivo (CTL+) inoculado com tumor e tratado com ciclofosfamida; Resveratrol (RSV) inoculado com tumor e tratado com Resveratrol; e Ciclofosfamida e Resveratrol (RSV+CP) inoculado com tumor e tratado com a associação. O gráfico suplementar (10s) representa o grupo sem tumor (Normal) e o grupo tratado com Resveratrol (RSV). Para a comparação entre o Grupo Normal e Controle negativo foi aplicado o teste t não pareado com o valor de \*\*\*\* $p < 0.0001$ . Os demais grupos ( $n=5$ ) foram comparados entre si através da média  $\pm$  desvio padrão com \*\* $p < 0.01$  e \*\*\* $p < 0.0001$  pelo teste ANOVA seguido de pós teste Kruskal-Wallis.

Na análise da área das fibras, os animais com tumor (CTL-) ( $0,4316 \pm 0,001$ ) apresentaram uma redução na área quando comparado com o grupo normal ( $0,9481 \pm 0,01$ ), mostrando a perda de massa muscular induzida pelo tumor. Por outro lado, os animais com tumor e tratados com RSV apresentaram um aumento na área, diferindo dos demais grupos inoculados com tumor. A área da fibrass não foi diferente entre os grupos controle negativo, controle positivo ( $0,6902 \pm 0,01$ ) e o tratado com RSV e Ciclofosfamida ( $0,6914 \pm 0,001$ ) (Figura 12). Nos grupos sem tumor, o RSV não alterou a área da fibra muscular quando comparado com o grupo normal (Figura 12s).



**Figura 12. Análise da área das fibras do músculo gastrocnêmio obtidas de camundongos no modelo de caquexia com tumor sólido de Ehrlich (HE 200x).** O gráfico barra representa o número da área das fibras do músculo determinadas com auxílio do software Image J. As imagens de corte transversal do músculo dos grupos: sem tumor e sem tratamento (Normal); Controle negativo (CTL-) inoculado com tumor, sem tratamento; Controle positivo (CTL+) inoculado com tumor e tratado com ciclofosfamida; Resveratrol (RSV) inoculado com tumor e tratado com Resveratrol; e Ciclofosfamida e Resveratrol (RSV+CP) inoculado com tumor e tratado com a associação. O gráfico suplementar (12s) representa o grupo sem tumor (Normal) e o grupo tratado com Resveratrol (RSV). Para a comparação entre o Grupo Normal e Controle negativo foi aplicado o teste Mann-Whitney com o valor de  $***p = 0.0002$ . Os demais grupos ( $n=5$ ) foram comparados entre si através da média  $\pm$  desvio padrão com  $**p < 0.01$  e  $****p < 0.0001$  pelo teste ANOVA seguido de pós teste Kruskal-Wallis.

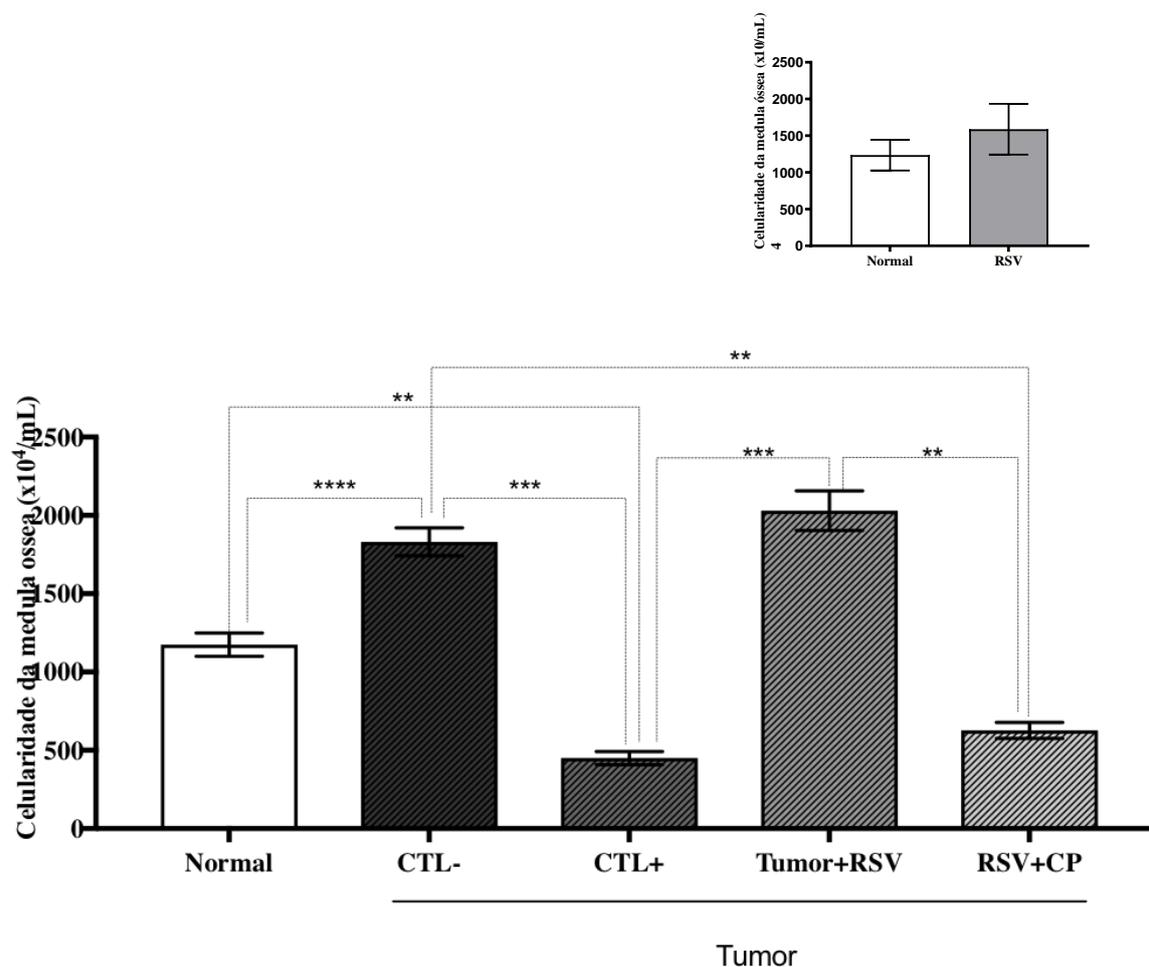
#### 5.4 AVALIAÇÃO DO RESVERATROL NA CELULARIDADE DE ORGÃOS DO SISTEMA IMUNE NO MODELO DE CAQUEXIA COM TUMOR SÓLIDO DE EHRLICH

Até o momento, os resultados mostraram que o tratamento com RSV não só controlou o desenvolvimento do tumor, como também apresentou uma melhora na análise qualitativa e quantitativa do tecido muscular esquelético. Com o objetivo de estudar os fatores que podem afetar a plasticidade do músculo na doença neoplásica, a resposta inflamatória está associada a caquexia, por outro lado, trabalhos relatam o efeito anti-inflamatório do RSV. Assim, se investigou a participação do sistema imune no modelo de caquexia induzido pelo tumor de Ehrlich.

Inicialmente foi realizado a contagem de células da medula óssea, por ser um órgão primário produtor de leucócitos. A indução do tumor de Ehrlich aumentou a Celularidade da medula óssea quando comparado ao animal normal (CTL-:  $1832 \times 10^4 \pm 28,7$  vs Normal:  $1174 \times 10^4 \pm 335,1$ ). Por outro lado, o tratamento com ciclofosfamida ( $450,2 \times 10^4 \pm 132,9$ ) apresentou uma redução na contagem das células.

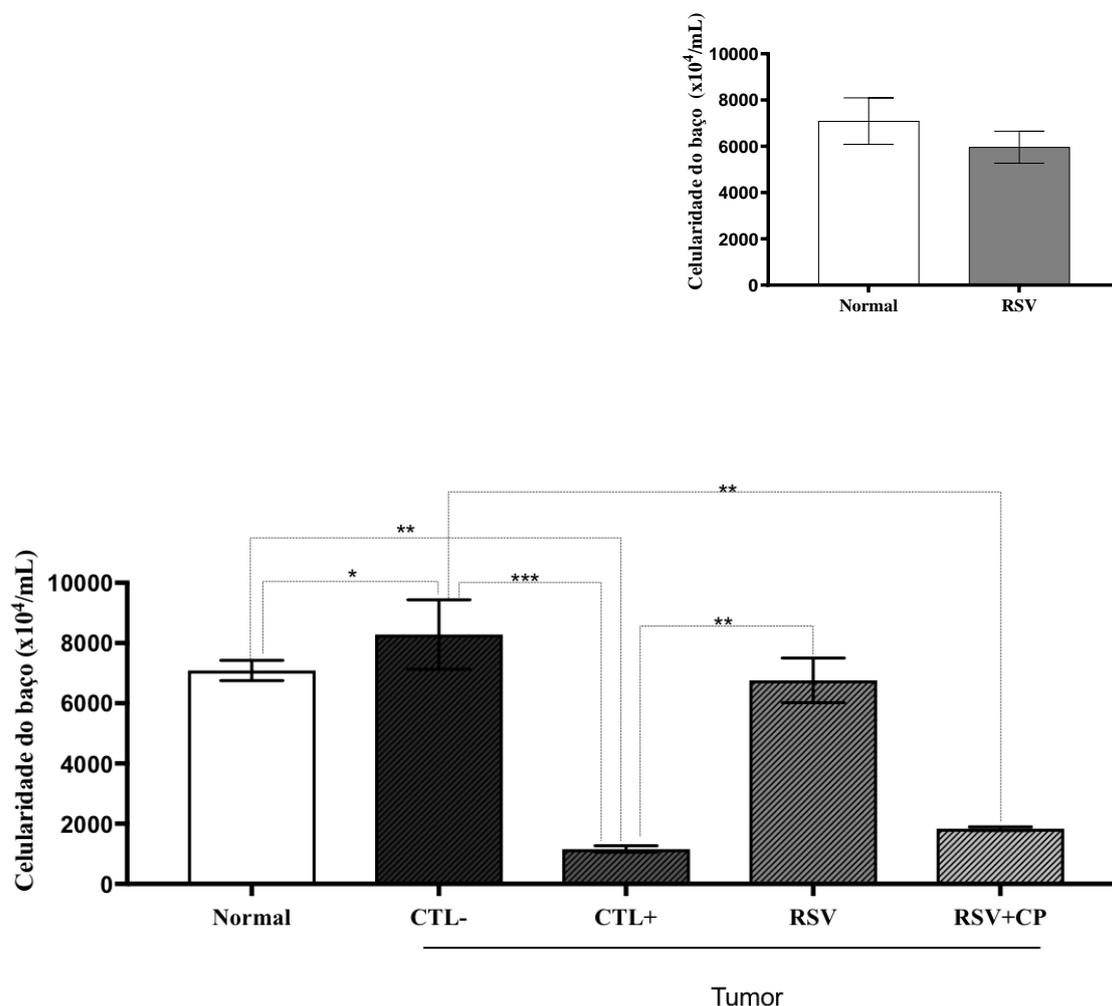
O grupo tratado com RSV ( $2030 \times 10^4 \pm 400,4$ ) mostrou uma Celularidade da medula óssea semelhante ao grupo controle negativo, enquanto que o grupo tratado com RSV e Ciclofosfamida ( $627,1 \times 10^4 \pm 159,8$ ) apresentou uma redução significativa comparado aos grupos controle negativo e tratado com RSV (Figura 13).

O Gráfico suplementar evidencia que o RSV não altera a produção de células da medula óssea, não mostrando diferença na contagem de células com o grupo normal (Figura 13s).



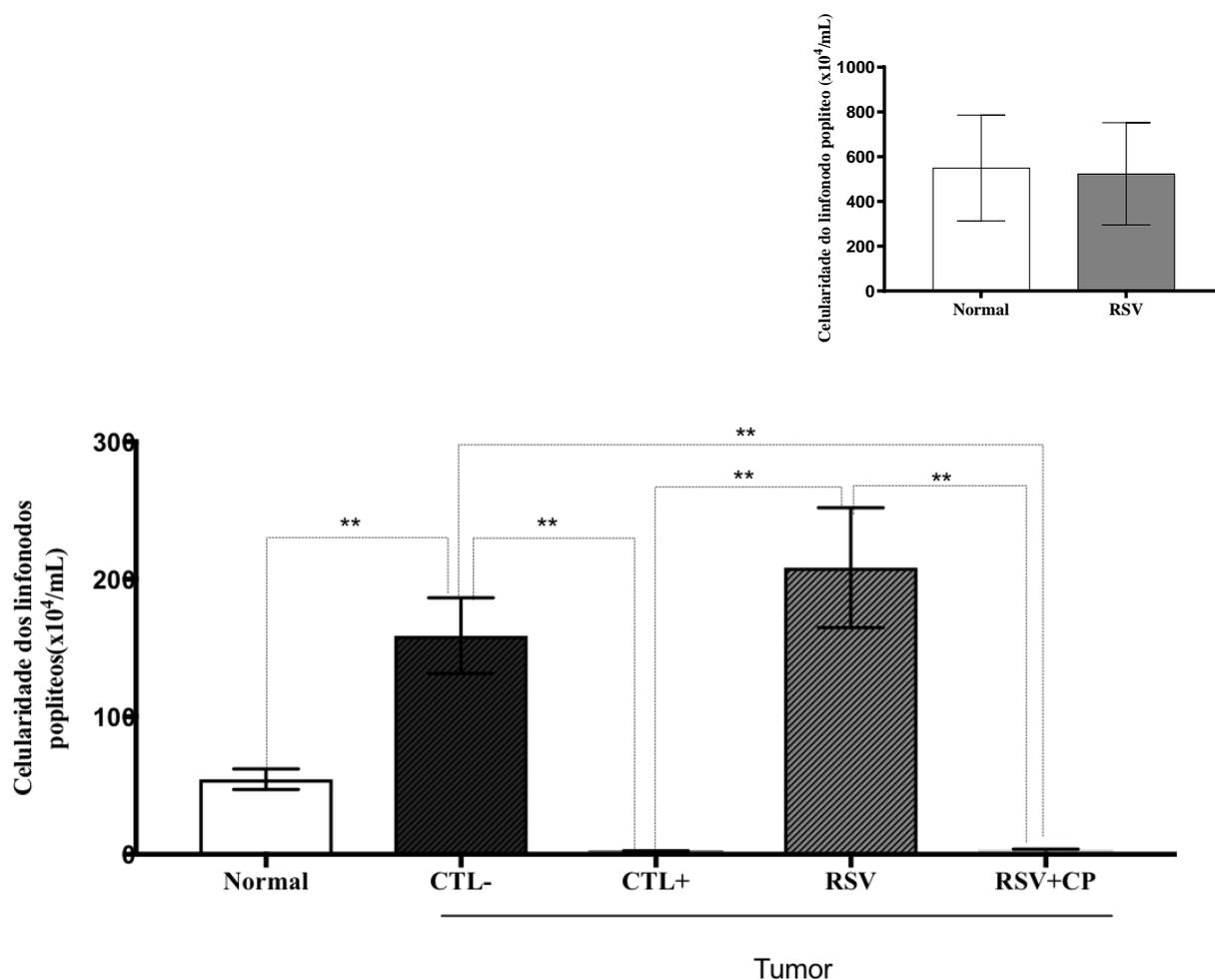
**Figura 13. Celularidade da Medula óssea no modelo de caquexia com tumor sólido de Ehrlich.** O gráfico barra representa a Celularidade média da medula óssea dos grupos: sem tumor e sem tratamento (Normal); Controle negativo (CTL-) inoculado com tumor, sem tratamento; Controle positivo (CTL+) inoculado com tumor e tratado com ciclofosfamida; Resveratrol (RSV) inoculado com tumor e tratado com Resveratrol; e Ciclofosfamida e Resveratrol (RSV+CP) inoculado com tumor e tratado com a associação. O gráfico suplementar (10s) representa o grupo sem tumor (Normal) e o grupo tratado com Resveratrol (RSV). Para a comparação entre o Grupo Normal e Controle negativo foi aplicado o teste t não pareado com o valor de  $***p < 0.0001$ . Os demais grupos ( $n=5$ ) foram comparados entre si através da média  $\pm$  desvio padrão com  $**p < 0.01$  e  $***p < 0.0001$  pelo teste ANOVA seguido de pós teste Kruskal-Wallis.

A contagem das células do baço também foram realizadas, por ser um órgão secundário importante na produção e maturação de leucócitos. O resultado na figura 14 mostra que o grupo controle negativo apresentou maior Celularidade ( $8286 \times 10^4 \pm 34$ ) em relação grupo tratado com Ciclofosfamida ( $1159 \times 10^4 \pm 322,4$ ) bem como o tratamento associado do RSV e Ciclofosfamida ( $1837 \times 10^4 \pm 170,5$ ). O grupo de animais inoculados com tumor e tratados com RSV ( $6763 \times 10^4 \pm 20$ ) aumentaram significativamente em relação ao controle positivo ( $1159 \times 10^4 \pm 924$ ), não diferindo do grupo controle negativo (Figura 14). O Gráfico suplementar (Figura 14s) mostra que nos grupos sem tumor o RSV ( $5708 \times 10^4 \pm 10,07$ ) não mostrou alteração quando comparado ao grupo normal ( $7091 \times 10^4 \pm 10,07$ ).



**Figura 14. Celularidade do Baço no modelo de caquexia com tumor sólido de Ehrlich.** O gráfico barra representa a Celularidade média do baço com tumor sólido de Ehrlich dos grupos: sem tumor e sem tratamento (Normal); Controle negativo (CTL-) inoculado com tumor, sem tratamento; Controle positivo (CTL+) inoculado com tumor e tratado com ciclofosfamida; Resveratrol (RSV) inoculado com tumor e tratado com Resveratrol; e Ciclofosfamida e Resveratrol (RSV+CP) inoculado com tumor e tratado com a associação. O gráfico suplementar (10s) representa o grupo sem tumor (Normal) e o grupo tratado com Resveratrol (RSV) para a comparação entre o Grupo Normal e Controle negativo foi aplicado o teste Mann-Whitney com o valor de \*p =0.01. Os demais grupos (n=5) foram comparados entre si através da média  $\pm$  desvio padrão com \*\*p<0.01 e \*\*\*p<0.0001 pelo teste ANOVA seguido de pós teste Kruskal-Wallis.

No modelo de tumor sólido induzido no membro dos animais, o linfonodo poplíteo encontra-se próximo ao sítio tumoral sendo um órgão imune que sofre influência do microambiente e está associado a infiltração de células tumorais (linfonodo sentinela). O resultado da contagem de células do linfonodo nos grupos com tumor mostrou um aumento significativo no grupo controle negativo ( $159 \times 10^4 \pm 87,01$ ) comparado com o grupo normal ( $104 \times 10^4 \pm 0,2$ ), tratado com Ciclofosfamida ( $2,1 \times 10^4 \pm 0,87$ ) bem como no tratamento associado do RSV e Ciclofosfamida ( $3,4 \times 10^4 \pm 1,17$ ). Os animais tratados com RSV ( $208,4 \times 10^4 \pm 138$ ) apresentaram uma contagem semelhante ao controle negativo e maior Celularidade comparados ao controle positivo e o tratamento associado do Resveratrol e Ciclofosfamida (Figura15). O Gráfico suplementar evidencia que o RSV não altera o número de células do linfonodo poplíteo, não mostrando diferença na contagem de células com o grupo controle (figura 15s).

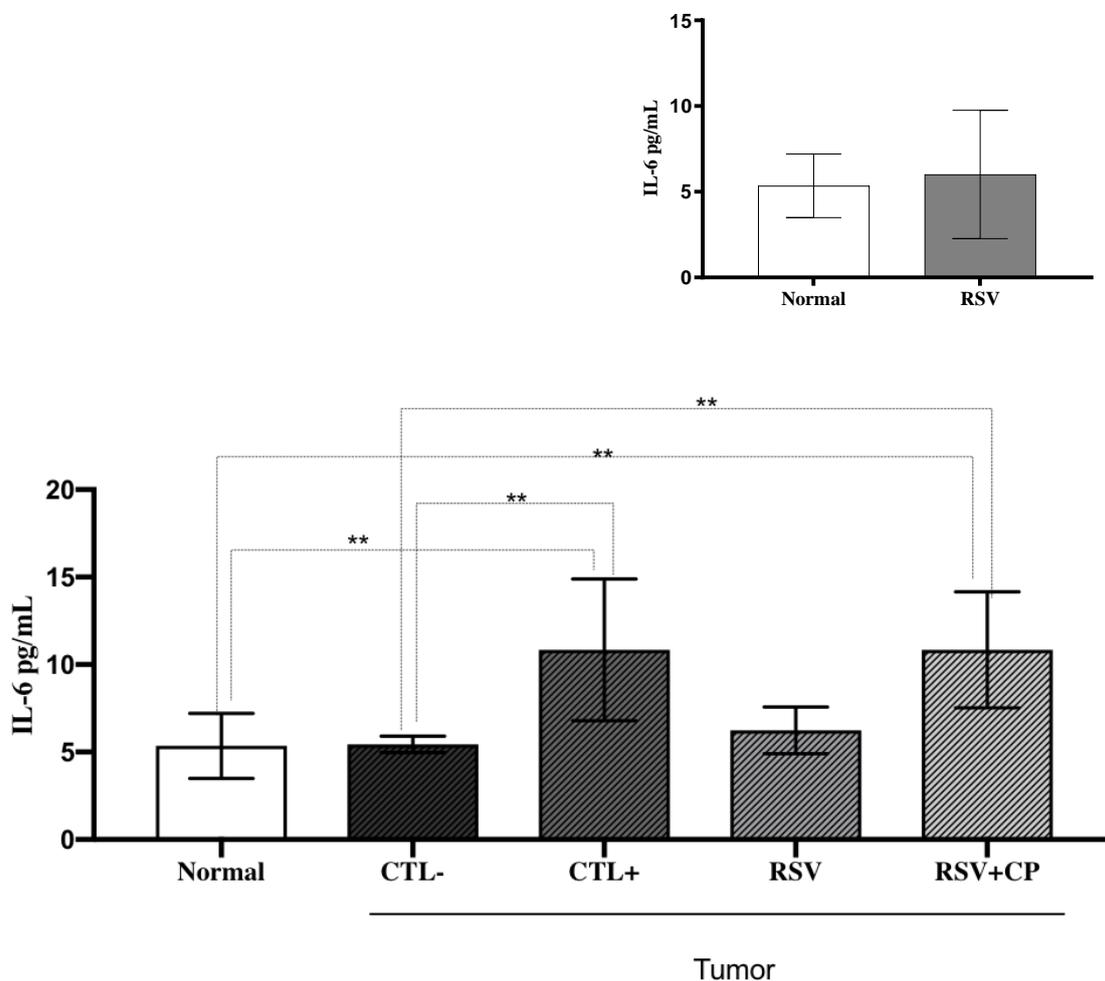


**Figura 15. Celularidade do linfonodo poplíteo no modelo de caquexia com tumor sólido de Ehrlich.** O gráfico barra representa a Celularidade média do linfonodo poplíteo com o tumor sólido de Ehrlich dos grupos: sem tumor e sem tratamento (Normal); Controle negativo (CTL) inoculado com tumor, sem tratamento; Controle positivo (CTL+) inoculado com tumor e tratado com ciclofosfamida; Resveratrol (RSV) inoculado com tumor e tratado com Resveratrol; e Ciclofosfamida e Resveratrol (RSV+CP) inoculado com tumor e tratado com a associação. O gráfico suplementar (10s) representa o grupo sem tumor (Normal) e o grupo tratado com Resveratrol (RSV). Para a comparação entre o Grupo Normal e Controle negativo foi aplicado o teste Mann-Whitney com o valor de  $**p=0.001$ . Os demais grupos ( $n=5$ ) foram comparados entre si através da média  $\pm$  desvio padrão com  $**p<0.01$  pelo teste ANOVA seguido de pós teste Kruskal-Wallis.

## 5.5 AVALIAÇÃO DO RESVERATROL EM MEDIADORES INFLAMATÓRIOS NO MODELO DE CAQUEXIA COM TUMOR SÓLIDO DE EHRLICH

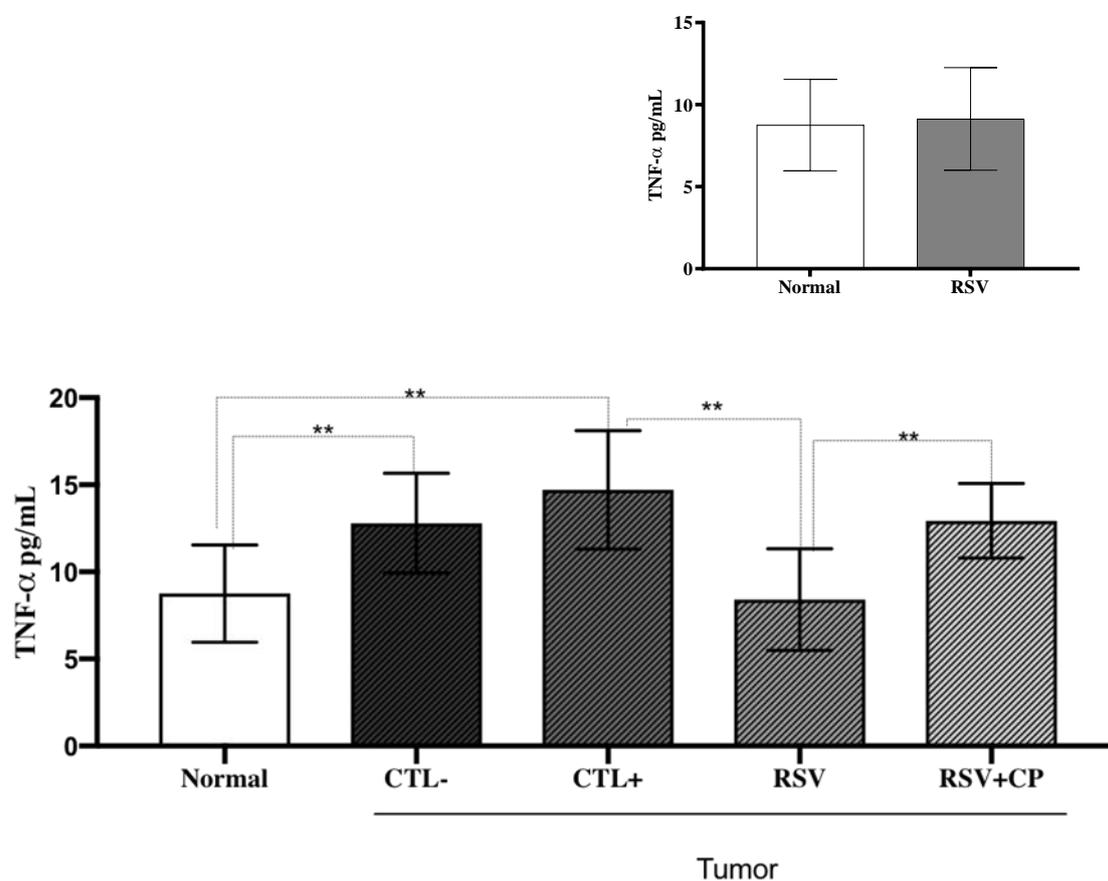
Após avaliar a Celularidade dos órgãos linfoides, foi avaliado o perfil de resposta imune através de produção de citocinas inflamatórias.

O resultado mostrou que a presença do tumor de Ehrlich não altera a concentração plasmática de IL-6 ( $5,4\text{pg/mL} \pm 0,46$ ), da mesma forma o tratamento com RSV ( $6,2\text{pg/mL} \pm 1,33$ ) quando comparados com o grupo normal ( $5,3\text{pg/mL} \pm 1,8$ ). Entretanto o tratamento com a Ciclofosfamida aumentou a produção de IL-6 quando comparado com o controle negativo, tanto no tratamento isolado ( $10,84\text{pg/mL} \pm 4,066$ ) quanto associado com RSV ( $10,84\text{pg/mL} \pm 3,312$ ) (Figura 16). O Gráfico suplementar mostra que o RSV ( $8,441\text{pg/mL} \pm 2,91$ ) não altera a concentração de IL-6 comparados ao animal controle ( $6,8\text{pg/mL} \pm 3,12$ ) (Figura 16s).



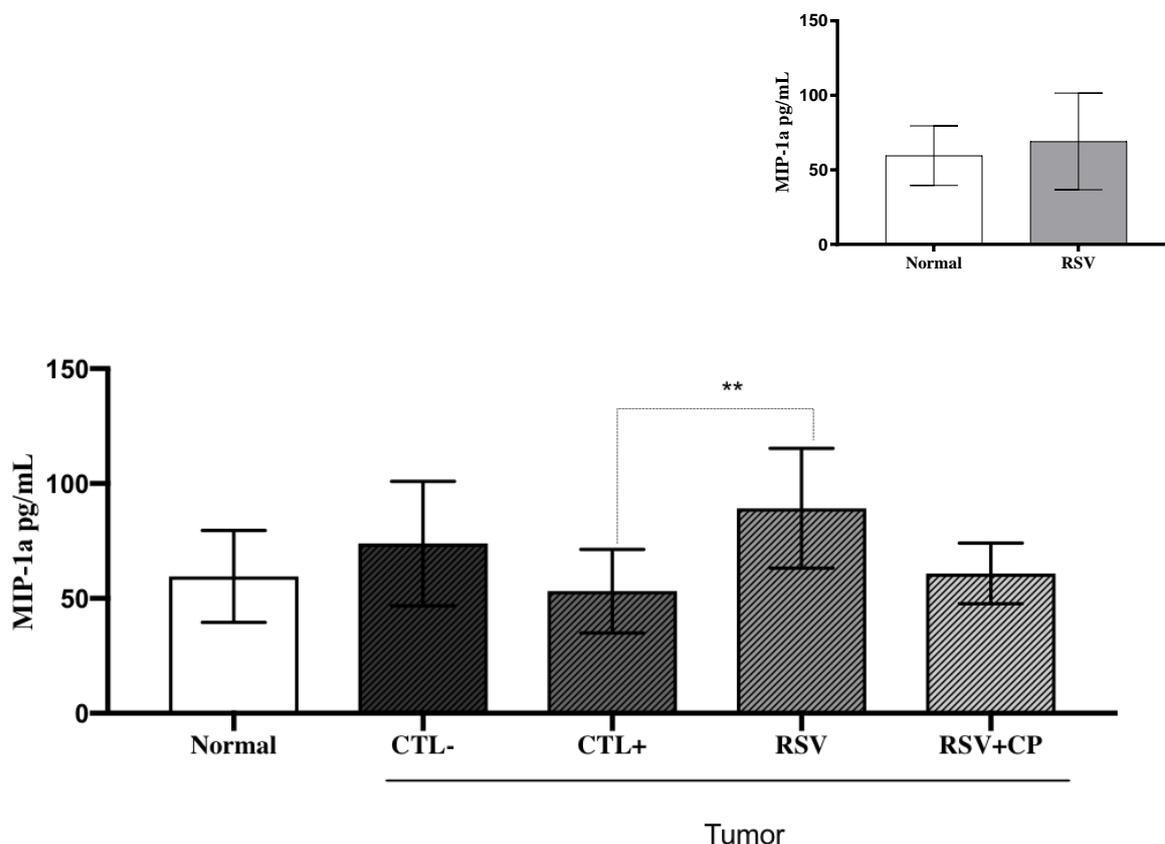
**Figura 16. Concentração plasmática de IL-6 no modelo de caquexia com tumor sólido de Ehrlich.** O gráfico barra representa a concentração média dos grupos com tumor sólido de Ehrlich dos grupos: sem tumor e sem tratamento (Normal); Controle negativo (CTL-) inoculado com tumor, sem tratamento; Controle positivo (CTL+) inoculado com tumor e tratado com ciclofosfamida; Resveratrol (RSV) inoculado com tumor e tratado com Resveratrol; e Ciclofosfamida e Resveratrol (RSV+CP) inoculado com tumor e tratado com a associação. O gráfico suplementar (10s) representa o grupo sem tumor (Normal) e o grupo tratado com Resveratrol (RSV). Os grupos (n=5) foram comparados entre si através da média  $\pm$  desvio padrão com  $**p < 0.01$  pelo teste ANOVA seguido de pós teste Kruskal-Wallis.

Os animais inoculados com o tumor de Ehrlich CTL- ( $12,8\text{pg/mL}\pm 2,8$ ) mostraram um aumento na concentração plasmática de TNF- $\alpha$  quando comparado ao animal sem tumor e sem tratamento ( $8,7\text{pg/mL}\pm 2,7$ ). O tratamento com RSV ( $8,40\text{pg/mL}\pm 2,91$ ) reduziu de forma significativa a concentração desta citocina quando comparado ao grupo tratado com Ciclofosfamida ( $14,71\text{pg/mL}\pm 3,39$ ) e Ciclofosfamida e RSV ( $12,9\text{pg/mL}\pm 2,1$ ), entretanto apresentando valores próximos ao grupo normal. (Figura17). A concentração média do TNF- $\alpha$  nos animais que não foram inoculados com tumor sem tratamento ( $8,75\text{pg/mL}\pm 2,78$ ) ou sem tumor tratados com RSV ( $9,13\text{pg/mL}\pm 3,12$ ) não foi diferente. (Figura17s).



**Figura 17. Concentração plasmática de TNF- $\alpha$  no modelo de caquexia com tumor sólido de Ehrlich.** O gráfico barra representa a concentração média dos grupos com tumor sólido de Ehrlich dos grupos: sem tumor e sem tratamento (Normal); Controle negativo (CTL-) inoculado com tumor, sem tratamento; Controle positivo (CTL+) inoculado com tumor e tratado com ciclofosfamida; Resveratrol (RSV) inoculado com tumor e tratado com Resveratrol; e Ciclofosfamida e Resveratrol (RSV+CP) inoculado com tumor e tratado com a associação. O gráfico suplementar (10s) representa o grupo sem tumor (Normal) e o grupo tratado com Resveratrol (RSV). Para a comparação entre o Grupo Normal e Controle negativo foi aplicado o teste t não pareado com o valor de  $**p = 0.005$ . Os demais grupos ( $n=5$ ) foram comparados entre si através da média  $\pm$  desvio padrão com  $**p < 0.01$  pelo teste ANOVA seguido de pós teste Kruskal-Wallis.

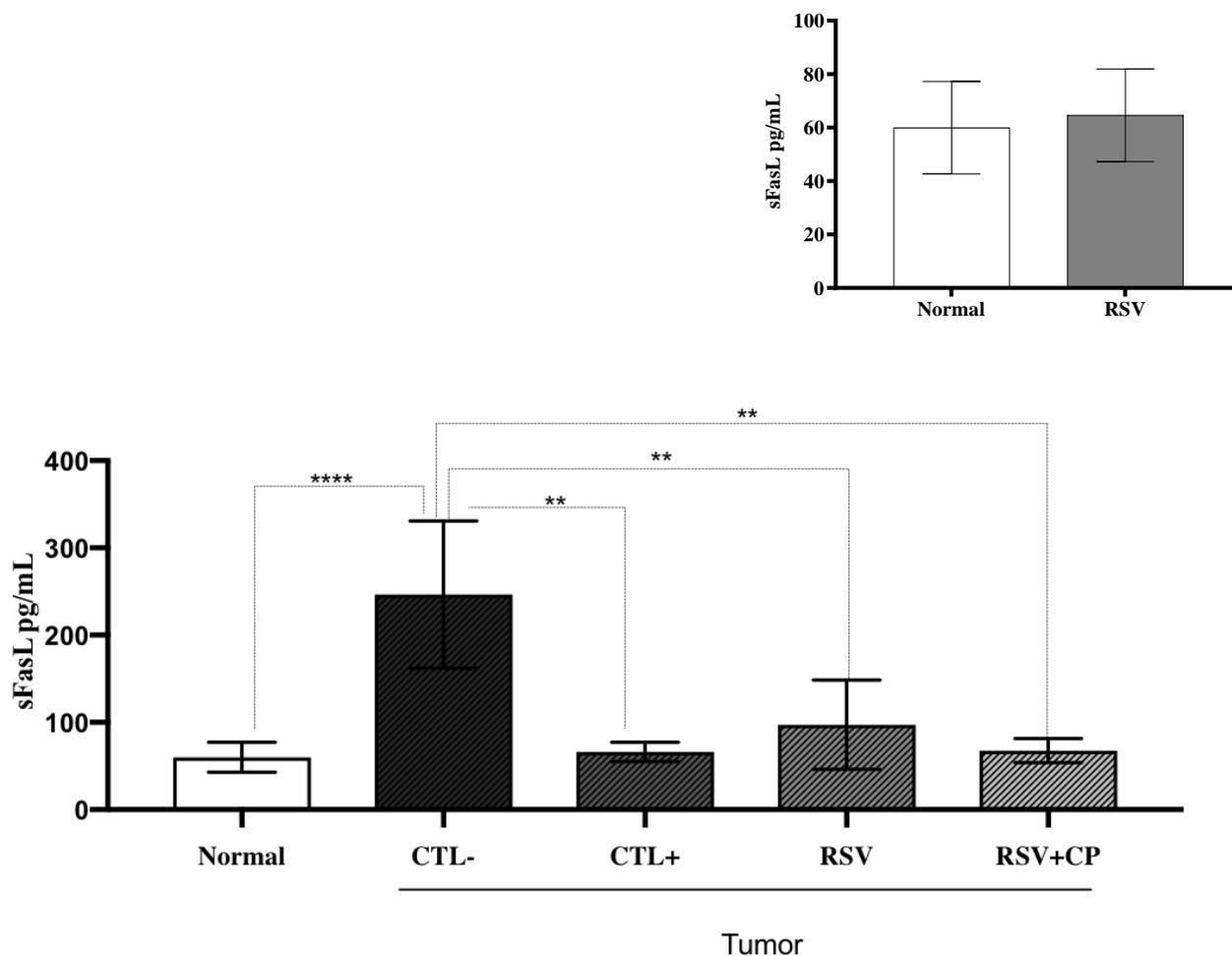
Outra citocina pesquisada foi a proteína inflamatória de macrófago (MIP-1 $\alpha$ ). Os resultados demonstraram que a presença do tumor de Ehrlich não induz a produção de MIP-1 $\alpha$ , entretanto o tratamento com RSV aumentou significativamente (89,19pg/mL $\pm$ 26,06) quando comparado com o tratado com Ciclofosfamida (53,15,354pg/mL $\pm$ 18,18). Os demais grupos não mostraram diferença significativa entre si (Figura 18). Nos grupos sem a inoculação do tumor, o tratamento com RSV (69,08pg/mL $\pm$ 32,42) não difere do grupo normal (59,56pg/mL $\pm$ 20) (Figura 18s).



**Figura 18. Concentração plasmática de MIP-1 $\alpha$  no modelo de caquexia com tumor sólido de Ehrlich.** O gráfico barra representa a concentração média dos grupos com tumor sólido de Ehrlich dos grupos: sem tumor e sem tratamento (Normal); Controle negativo (CTL-) inoculado com tumor, sem tratamento; Controle positivo (CTL+) inoculado com tumor e tratado com ciclofosfamida; Resveratrol (RSV) inoculado com tumor e tratado com Resveratrol; e Ciclofosfamida e Resveratrol (RSV+CP) inoculado com tumor e tratado com a associação. O gráfico suplementar (10s) representa o grupo sem tumor (Normal) e o grupo tratado com Resveratrol (RSV). Os grupos (n=5) foram comparados entre si através da média  $\pm$  desvio padrão com  $**p < 0.01$  pelo teste ANOVA seguido de pós teste Kruskal-Wallis.

## 5.6 AVALIAÇÃO DO RESVERATROL NA INDUÇÃO DE MEDIADOR PRÓ-APOPTOTICO NO MODELO DE CAQUEXIA COM TUMOR SÓLIDO DE EHRLICH

Considerando o perfil inflamatória modulado pelo RSV avaliamos a concentração da forma solúvel do Ligante do Fator Relacionado Apoptose (sFasL) por participar do mecanismo da progressão do tumor associado a regulação do TNF- $\alpha$ . A figura 19 mostra que os animais com tumor de Ehrlich que não receberam tratamento apresentaram concentrações plasmáticas elevadas de sFasL com parado aos demais grupos : Normal (59,98pg/mL $\pm$ 17,29), tratado com Ciclofosfamida (66,1pg/mL $\pm$ 11,08), tratado com RSV (97,23pg/mL $\pm$ 51,21) e com o tratamento associado com RSV e Ciclofosfamida (67,63pg/mL $\pm$ 13,84) (Figura 19). No contexto fisiológico, sem tumor, o RSV (64,6pg/mL $\pm$ 17,33) não modifica a concentração de sFasL comparado grupo normal (59,98pg/mL $\pm$ 17,29) (Figura 19s).

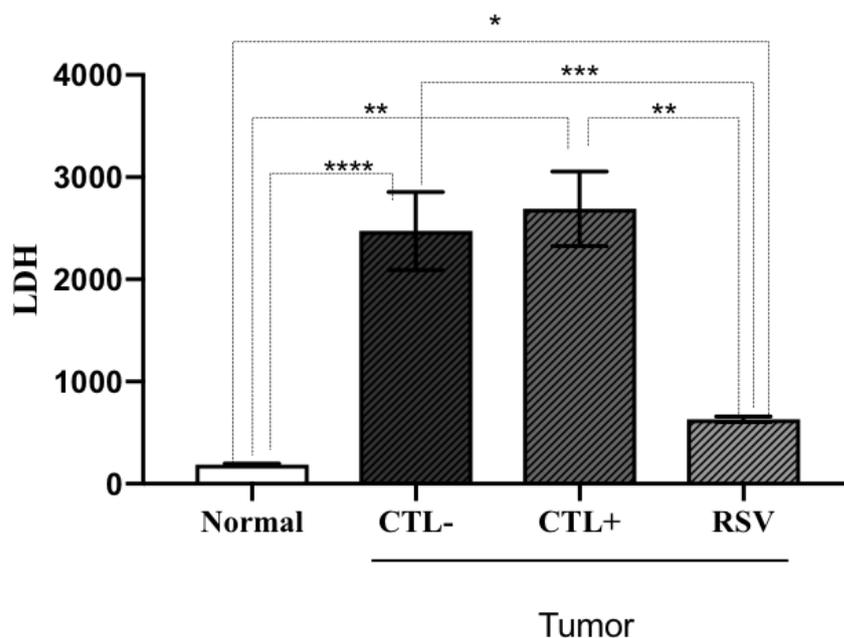


**Figura 19. Concentração de sFasL no modelo de caquexia com tumor sólido de Ehrlich.** O gráfico barra representa a concentração média dos grupos com tumor sólido de Ehrlich dos grupos: sem tumor e sem tratamento (Normal); Controle negativo (CTL-) inoculado com tumor, sem tratamento; Controle positivo (CTL+) inoculado com tumor e tratado com ciclofosfamida; Resveratrol (RSV) inoculado com tumor e tratado com Resveratrol; e Ciclofosfamida e Resveratrol (RSV+CP) inoculado com tumor e tratado com a associação. O gráfico suplementar (10s) representa o grupo sem tumor (Normal) e o grupo tratado com Resveratrol (RSV). Para a comparação entre o Grupo Normal e Controle negativo foi aplicado o teste Mann-Whitney com o valor de \*\*\*\* $p < 0.0001$ . Os demais grupos ( $n=5$ ) foram comparados entre si através da média  $\pm$  desvio padrão com \*\* $p < 0.01$  pelo teste ANOVA seguido de pós teste Kruskal-Wallis.

## 5.7 EFEITO DO RESVERATROL EM PARÂMETROS BIOQUÍMICOS NO MODELO DE CAQUEXIA COM TUMOR DE EHRLICH

A partir dos resultados das citocinas e com o aumento do sFasL, como possível mecanismo de escape do tumor de Ehrlich, foi avaliado os parâmetros de Lactato desidrogenase (LDH) para citotoxicidade e os marcadores Transaminase glutâmico-oxalacética (TGO) e Transaminase glutâmico pirúvica (TGP) para hepatotoxicidade.

O grupo inoculado com tumor de Ehrlich CTL-: ( $2474\text{pg/mL} \pm 400,5$ ) e o grupo com tumor e tratado com ciclofosfamida CTL+: ( $2691\text{pg/mL} \pm 382,6$ ): apresentaram um aumento da concentração da enzima LDH quando comparado ao grupo normal ( $187,5\text{pg/mL} \pm 10,82$ ) e ao grupo tratado com RSV, sugerindo uma citotoxicidade. (Figura 20).

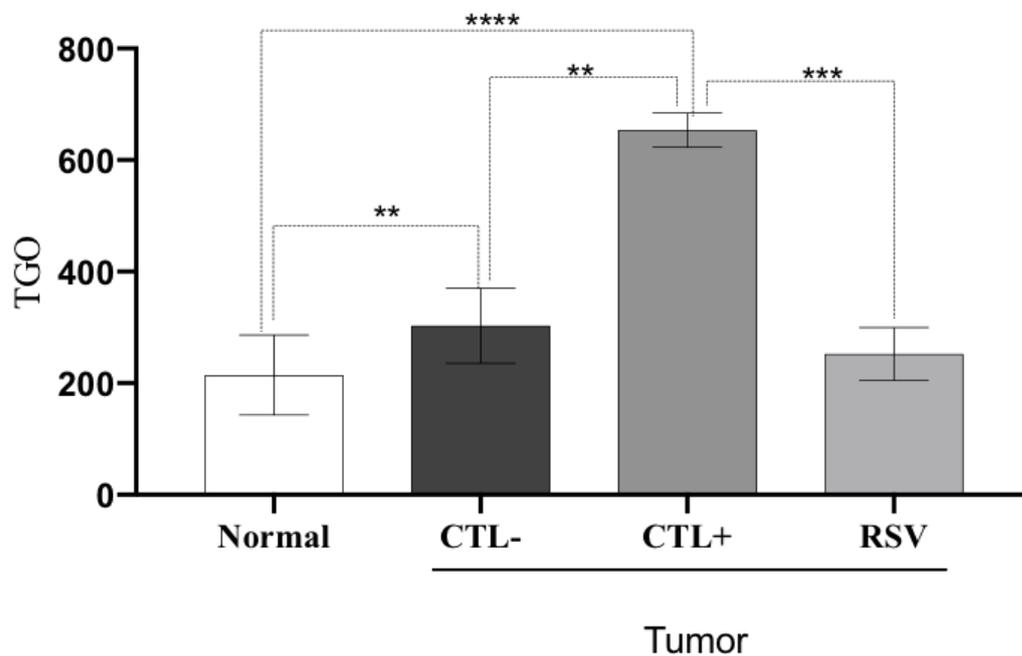


**Figura 20. Concentração do LDH no nível plasmático no modelo de caquexia com tumor sólido de Ehrlich.** O gráfico barra representa a concentração média no tumor sólido de Ehrlich comparando o grupo sem tumor e sem tratamento (Normal) sem tratamento (CTL-: controle negativo), tratado com ciclofosfamida (CTL+: controle positivo), tratado com Resveratrol (RSV). Para a comparação entre o Grupo Normal e Controle negativo foi aplicado o teste não pareado com o valor de \*\*\*\* $p < 0.0001$ . Os demais grupos ( $n=5$ ) foram comparados entre si através da média  $\pm$  desvio padrão com \*\* $p < 0.001$  pelo teste ANOVA seguido de pós Kruskal-Wallis.

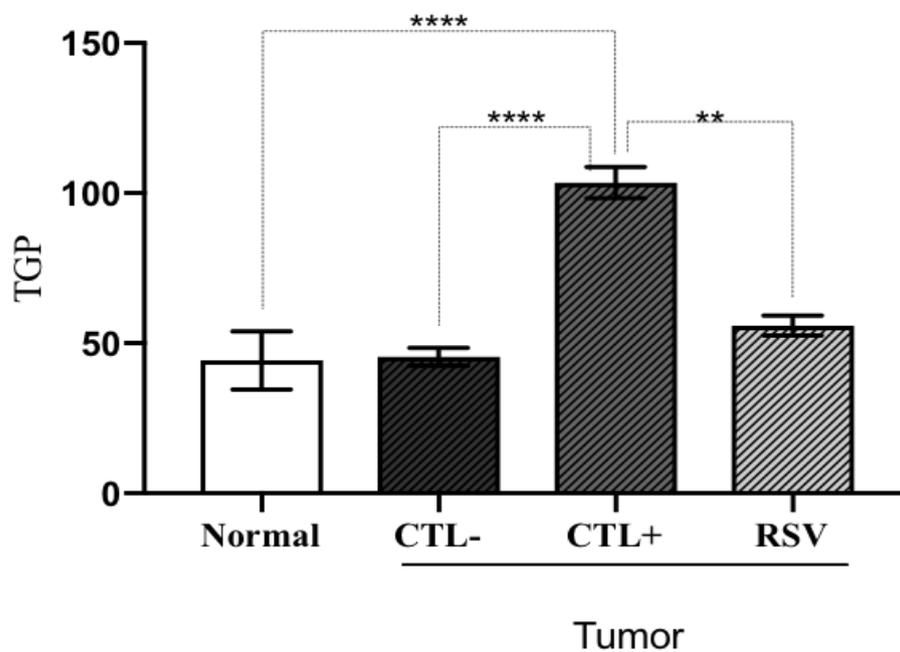
Considerando a citotoxicidade avaliada pela LDH, foi investigado possíveis efeitos hepatotóxicos devido aos tratamentos, através das concentrações plasmáticas das enzimas TGO e TGP.

Na concentração de TGO os resultados mostraram um aumento significativo no tratamento com Ciclofosfamida ( $653,7\text{pg/mL} \pm 32,23$ ) em comparação com grupo normal ( $214,5\text{pg/mL} \pm 75,04$ ), e tratado com RSV ( $252,1\text{pg/mL} \pm 49,63$ ) (Figura 21).

De forma semelhante a concentração de TGP foi elevada no grupo tratado com Ciclofosfamida ( $103,5\text{pg/mL} \pm 10,1$ ) comparado ao grupo normal ( $44,27\text{pg/mL} \pm 3,1$ ), com tumor sem tratamento CTL-: ( $45,4\text{pg/mL} \pm 3,1$ ) e tratado com RSV ( $55,83\text{pg/mL} \pm 3,48$ ) (Figura 22). Destaca-se que neste estudo o modelo do tumor de Ehrlich não foi capaz de alterar de forma significativa as concentrações fisiológicas de TGO e TGP



**Figura 21. Concentração do TGO no nível plasmático no modelo de caquexia com tumor sólido de Ehrlich.** O gráfico barra representa a concentração média no tumor sólido de Ehrlich comparando o grupo sem tumor e sem tratamento (Normal) sem tratamento (CTL-: controle negativo), tratado com ciclofosfamida (CTL+: controle positivo), tratado com Resveratrol (RSV). Para a comparação entre o Grupo Normal e Controle negativo foi aplicado o teste não pareado com o valor de \*\*\*\* $p < 0.0001$ . Os demais grupos ( $n=5$ ) foram comparados entre si através da média  $\pm$  desvio padrão com \*\* $p < 0.001$  pelo teste ANOVA seguido de pós Kruskal-Wallis.



**Figura 22. Concentração do TGP no nível plasmático no modelo de caquexia com tumor sólido de Ehrlich.** O gráfico barra representa a concentração média no tumor sólido de Ehrlich comparando o grupo sem tumor e sem tratamento (Normal) sem tratamento (CTL-: controle negativo), tratado com ciclofosfamida (CTL+: controle positivo), tratado com Resveratrol (RSV). Os grupos (n=5) foram comparados entre si através da média  $\pm$  desvio padrão com  $**p < 0.001$  pelo teste ANOVA seguido de pós Kruskal-Wallis.

## 6 DISCUSSÃO

Durante o desenvolvimento neoplásico a caquexia apresenta-se como um quadro de agravamento da doença, podendo comprometer o paciente em vários aspectos físicos e emocionais (LOUMAYE & THISSEN, 2017). Estudos em pacientes com caquexia neoplásica não são comuns pela debilidade e fragilidade do paciente que muitas vezes se encontram em fase avançada da doença. Assim, modelos animais vêm sendo estudados para melhorar o tratamento e qualidade de vida nos pacientes oncológicos. Neste trabalho propusemos estudar o potencial do Resveratrol como uma droga adjuvante, avaliando seus efeitos no desenvolvimento do tumor e nos mecanismos inflamatórios associados a caquexia.

Entre os modelos tumorais, o tumor de Ehrlich é um método bastante utilizado no nosso grupo de pesquisa (NASCIMENTO et al., 2006; REIS et al., 2012; FORTES, 2009; SERRA, 2016; NASCIMENTO, 2018). D'Agli (1989) e Nery (2004) descreveram o tumor de Ehrlich como detentor de alta capacidade imunogênica, crescimento acelerado e agressivo, que promove rápida invasão tecidual. Além disso, tem sido aplicado em modelos para estudo da caquexia neoplásica (VIOLATO et al., 2014).

Neste trabalho, os resultados mostraram que houve o tumor sólido de Ehrlich concomitante ao desenvolvimento do quadro caquético no animal, apresentando uma resposta inflamatória sistêmica e ativando órgãos linfoides primários, secundários, além de depreciar o tecido muscular esquelético e diminuir a reserva de adipócitos. Por essa razão, o referido modelo tem sido utilizado para estudo de ação terapêutica de componentes químicos, físicos e biológicos sobre o crescimento, patogênese, imunologia, citogenética e terapêutica de células tumorais (SEGURA et al., 2000; MADY, 2002; PALERMO-NETO et al., 2003; SILVA, 2003).

O desenvolvimento da caquexia desvelou no 14º (décimo quarto) dia do desenvolvimento do tumor sólido de Ehrlich, apresentando características inflamatórias sistêmicas. Estudos realizados com o modelo de tumor sólido de Ehrlich, mostraram que o estado caquético se instala a partir do décimo dia da inoculação, gerando nas células tumorais alterações imunológicas, teciduais (FRAJACOMO et al., 2016) e metabólicas (VIOLATO et al., 2014).

O consumo alimentar foi avaliado como outro indicativo da caquexia, mostrando-se diminuído no grupo com tumor, podendo representar efeitos estabelecidos na síndrome anorexia-caquexia, tal fato indica que este distúrbio pode ser associado ao modelo. Segundo Muscaritoli et al. (2010), a anorexia é um sintoma muito comum nas neoplasias, inicialmente relacionada ao processo natural da doença ou, mais tardiamente, à progressão do crescimento tumoral e presença de metástases levando à perda de peso.

Os animais do presente estudo não apresentaram perda de peso no grupo inoculado com tumor quando comparados aos animais saudáveis. No entanto, uma revisão de literatura apontou que a relação entre a progressão da caquexia, a perda do peso ao longo do tempo e que o índice de massa corpórea (IMC) em pacientes com câncer precisa de uma definição mais clara e concisa, por não mostrarem padrões bem estabelecidos (GREENLEE et al., (2017).

Em contrapartida, outro estudo destaca que as alterações no tecido adiposo têm sido documentadas pelo aumento do metabolismo dos carboidratos e lipídios no modelo de caquexia no câncer (VIOLATO et al., 2014). Os resultados apresentaram uma diminuição da gordura intraperitoneal nos camundongos neoplásicos comparados ao grupo Normal, sugerindo um aumento da lipólise dos adipócitos. Agustsson et al., (2007) demonstraram que a perda da gordura intraperitoneal é atribuída ao aumento da lipólise e processos inflamatórios que podem favorecer a progressão tumoral com uma maior perda na gordura abdominal, corroborando com os resultados.

A progressão do tumor, produzindo alterações sistêmicas, resultam em modificações do tecido muscular com aumento do catabolismo e inflamação crônica (VAGNILDHAUG 2018; TISTALE 2002; HAEHLING 2010). Tal resposta clínica de perda no músculo estriado esquelético está associada a um prognóstico de evolução do câncer, com a consequente diminuição da atividade física, aumento da fadiga, diminuição da qualidade de vida e ocorrência de anorexia, resultando na redução da tolerância a tratamentos medicamentosos e decréscimo da sobrevida dos pacientes (FEARON et al., 2005; DEWS 1980).

O músculo estriado esquelético foi avaliado na progressão do tumor de Ehrlich e os dados mostraram um estado caquético caracterizado pelo desgaste muscular e diminuição da gordura intraperitoneal no grupo com tumor. O desgaste do tecido muscular foi verificado pelo peso do

músculo gastrocnêmio e redução da área média da fibra muscular após 14 dias de desenvolvimento do tumor. Nesse ponto, os músculos secos e desidratados, sinalizaram um estado catabólico e uma maior proteólise do tecido muscular no grupo com tumor, sugerindo a presença de caquexia, além da associação na diminuição da gordura intraperitoneal e anorexia, semelhante a outros modelos de caquexia no câncer (FRAJACOMO et al., 2016; VIOLATO et al., 2014, NETO, 1996; REBECA et al., 2008).

Silva, et al (2006) mostrou que a gravidade da caquexia no câncer encontra-se diretamente relacionada com a progressão do tumor mostrando-se prevalente em estágios mais avançados mesmo em modelos experimentais. Outros estudos apontam a perda muscular como a característica negativa mais importante em pacientes com caquexia, por gerar consequências como a fadiga, diminuição da qualidade de vida e aumento da mortalidade (DEWS, 1980; SILVA et al., 2008; SCHMIDT et al., 2018). Mostrando, dessa forma, que nosso modelo foi uma escolha adequada para o estudo.

O tratamento da caquexia no câncer envolve várias fases e diferentes objetivos, podendo ser curativo, paliativo ou de suporte. Embora evidências tem sido divulgada para revelar os mecanismos moleculares da perda da massa muscular, apenas alguns tratamentos, incluindo fatores de crescimento específicos e esteroides anabólicos, estão disponíveis na prática clínica para caquexia e condições debilitantes (GULLETT et al., 2010).

Nesse contexto, ainda não há na literatura um padrão definido de tratamento efetivo para neutralizar a perda progressiva do tecido muscular, apesar da importância do tratamento da caquexia neoplásica e consequentemente modulação da resposta inflamatória crônica causada pelo tumor. No entanto os esforços científicos têm buscado definir terapias contra a caquexia relacionada ao câncer, combinando diferentes intervenções farmacológicas (BATH et al., 2011).

Na busca de estudar alternativa aos tratamentos anticâncer convencionais, novas drogas têm sido criadas a partir de metabólitos secundários obtidos de plantas (MARELLI et al., 2018). Esses atributos têm estimulado o interesse em identificar agentes antitumorais derivados de fontes naturais, e no nosso trabalho escolhemos o RSV por ser um flavonoide com efeitos bem estabelecidos no câncer.

O RSV é um dos flavonoides naturais mais importantes e tem sido objeto de amplos estudos. Foi demonstrado que a substância possui propriedades de promoção da saúde, dentre as quais destacam-se as atividades antitumoral (WANG et al., 2010) e anti-inflamatória (PATEL et al., 2011).

Nossos dados com o uso do RSV se mostrou benéfico para a diminuição do tumor de Ehrlich, contendo o desenvolvimento do volume tumoral a partir do 5º dia de inoculação comparado ao grupo tumor sem tratamento. O Resveratrol não deixou que houvesse a expansão do volume tumoral nos animais, esses dados colaboram com a diminuição do peso da pata que estava inoculada com tumor da forma sólida dos animais tratados com RSV. Estudos apontam que o RSV tem a capacidade de inibir a proliferação de uma ampla variedade de células tumorais humanas *in vitro* (SHUKLA et al., 2011). Estudos pré-clínicos em animais mostraram o potencial do RSV na quimio-intervenção. Modelos de adenocarcinoma mamário em camundongos e ratos demonstraram que o RSV induziu uma redução acentuada do crescimento do tumor e angiogênese (BHAT et al., 2011; MONDAL et al., 2011).

Jang et al. (1997) demonstraram, pela primeira vez, os efeitos quimiopreventivos do RSV na inibição da carcinogênese multiestágio. Desde então variados estudos vem evidenciando a ação deste composto em diversos tipos de câncer em diferentes estágios de desenvolvimento, como por exemplo o estudo de Kraft et al, (2019) que mostrou como o RSV afeta todos os estágios distintos da carcinogênese (iniciação, promoção e progressão) por meio da modulação das vias de transdução de sinal que controlam a divisão e crescimento celular, apoptose, inflamação, angiogênese e metástase. Outros estudos demonstraram a diminuição do tumor em câncer de mama (LEE et al., 2012), pele (KALRA et al., 2008), próstata GANAPATHY et al., 2010) colo retal (SAUD et al., 2014), fígado (LIN et al., 2012), pâncreas (KUROIWA et al., 2006), pulmão (LEE et al., 2006), câncer de ovário (LEE et al., 2009), bexiga (BAI et al., 2010) estômago (ZHOU et al., 2005) e cabeça e pescoço (HU et al., 2012). Todos esses dados colaboram com o efeito antitumoral do nosso estudo com RSV no modelo de tumor de Ehrlich.

Considerando que a perda progressiva do tecido muscular é um sintoma de evolução do câncer e que a complexidade da caquexia tem fornecido uma barreira para o desenvolvimento de

terapias bem-sucedidas para prevenir ou tratar a doença, estratégias terapêuticas com o uso do RSV para prevenir a perda do tecido muscular vêm sendo estudadas.

Sobre este enfoque, nossos resultados mostraram que o RSV impediu a perda do peso do tecido muscular causado pelo tumor de Ehrlich. Além disso, o RSV induziu uma melhora na área da seção transversal das fibras dos músculos colaborando com a diminuição da atrofia das fibras musculares. Quando observamos qualitativamente as fibras musculares dos animais tratados com RSV verifica-se que estas estão em melhores condições morfológicas, ou seja, com contornos poligonais bem definidos, núcleos localizados periféricamente, sarcoplasma homogêneo em comparação com o grupo que tem tumor e com o grupo com tumor tratamento quimioterápicos.

Mesmo não sendo no contexto tumoral, Benette, (2013) demonstrou o aumento de células precursoras no tratamento com RSV no músculo plantar de ratos idosos. Stephen (2017) também mostrou melhora na função mitocondrial que foi associada a uma melhor via de sinalização anabólica levando à hipertrofia dos tamanhos das fibras pela célula satélite. Esses estudos colaboram com o potencial do RSV em reduzir ou reverter a perda muscular. Nossos dados de atenuação de atrofia usando RSV 10mg/Kg são semelhantes aos dados de HORI (2011) que demonstrou que camundongos exibiram menor atrofia muscular ao receberem RSV.

O grupo tratado com ciclofosfamida apresentou maior prejuízo no peso úmido do tecido muscular semelhante ao grupo tumor, apontando que as intervenções terapêuticas para o tratamento do câncer podem caracterizar desequilíbrios e prejuízos distintos para o músculo, impostos pelos fatores patológicos da caquexia (BARRETO et al., 2016). Até o momento, poucos estudos investigaram diretamente o efeito do câncer e da quimioterapia no músculo esquelético associado a caquexia.

No nosso modelo experimental de acordo com os achados histológicos mostraram que os animais tratados com Ciclofosfamida tanto qualitativamente quanto quantitativamente, apresentaram maior incidência de alterações musculares, mesmo quando associado com RSV. Barreto et al. (2016) identificaram que as vias metabólicas comuns ativadas pela caquexia induzida por quimioterápico conseguem mostrar uma regulação negativa na produção das proteínas musculares. Evidências revelaram uma correlação entre a caquexia no câncer e a

toxicidade quimioterápica gerando um impacto negativo na proteólise muscular, perda da gordura e anorexia. (JUNG, 2015; PRADO, 2009). Outro estudo mostrou que conforme o avanço da idade do hospedeiro, o tratamento quimioterápico pode gerar um impacto negativo no tecido muscular esquelético entre 40% até 91,6% dos pacientes (CAILLET, 2016).

Nossos resultados colaboram com a literatura e demonstram que embora o tratamento quimioterápico consiga controlar o crescimento tumoral, pode ocorrer uma maior perda do tecido muscular, porque o músculo esquelético responde a uma infinidade de sinais sistêmicos. Desta forma, a resposta inflamatória sistêmica e a mediadores metabólicos que podem ser alterados com o câncer e a quimioterapia influenciam os mecanismos de formação, manutenção e regeneração do músculo (ATHERTON et al., 2016).

Diante disso, o presente trabalho focou o estudo nos mediadores inflamatórios e no sistema imunológico para compreender o mecanismo da caquexia induzida pelo tumor. O sistema imune do hospedeiro influencia e é influenciado pelo microambiente tumoral (HANAHAN & WEINBERG, 2011), desempenhando um papel crítico na vigilância de tumores (SCHREIBER et al., 2011; TENG et al., 2015). Evidências sugerem que os mesmos tipos de células imunes infiltrantes de tumores às vezes têm efeitos diferentes no hospedeiro (FRIDMAN et al., 2012, REMARK et al., 2013).

Os dados mostraram que a presença do tumor Ehrlich induziu a proliferação das células da medula óssea, baço e linfonodo, no entanto os animais tratados com RSV não mostraram alteração na celularidade. Na avaliação do tratamento quimioterápico, a droga mostrou diminuir as células da medula óssea (órgão primário), baço (órgão secundário) e linfonodo (órgão secundário drenante, próximo ao tumor) nos animais tratados com Ciclofosfamida associado ou não ao RSV. Estudos apontam que o tratamento com os quimioterápicos atua principalmente no bloqueio do ciclo de divisão celular em células tumorais, mas afetam também tecidos normais como os órgãos linfoides, causando uma imunossupressão (BHATTACHARJEE et al., 2017; SZATROWSKI, 1991; ANGULO et al., 2000). A Ciclofosfamida é bem estabelecida na imunossupressão do hospedeiro (HANDOLIAS et al., 2013; NAWATA et al., 2017). Assim, apesar do quimioterápico controlar o desenvolvimento do tumor, seus efeitos nos órgãos

linfoides reduzem a geração e maturação dos leucócitos, por outro lado o RSV teve o mesmo efeito antitumoral, sem induzir imunossupressão.

Diante da resposta dos órgãos linfoides, foram avaliadas as citocinas inflamatórias, verificando que o perfil do tratamento com RSV se diferencia do tumor sólido de Ehrlich sem tratamento. Estudos demonstram que a resposta inflamatória produz alguns fatores pelas células tumorais e possuem um papel importante no mecanismo da patogênese da caquexia (SARMA et al., 2011; FINN, 2012). Citocinas pró-inflamatórias são expressas pelo microambiente tumoral e também como resposta à inflamação sistêmica (PATEL, 2017).

Foi observado que o controle negativo produziu TNF- $\alpha$  e IL-6, em contrapartida a Ciclofosfamida mesmo sendo imunossupressora, manteve o perfil inflamatório das citocinas, com elevação significativa de IL6 comparado ao controle negativo. Estudos com camundongos inoculados com outro tipo tumoral mostraram uma perda de músculo esquelético acentuada quando comparados ao aumento da expressão de IL-6 durante a caquexia no câncer (WHITE, 2013, BONETTO, 2012). Outras evidências mostraram que a exposição crônica à IL-6 também resultou na indução da perda de massa muscular esquelética, tanto pela ativação direta como indireta de vias envolvidas no metabolismo que podem gerar inflamação e catabolismo muscular (WHITE 2013, BONETTO, 2011).

O tratamento com RSV diminuiu o TNF- $\alpha$  e aumentou MIP-1 $\alpha$ , modulando a inflamação. A redução do TNF- $\alpha$  e a elevação do MIP-1 $\alpha$  sugerem uma regulação mais eficiente na indução do reconhecimento e imunovigilância, regulando a inflamação e ativando linfócitos efetores. O TNF- $\alpha$  é uma citocina que apresenta um papel paradoxal na carcinogênese, mesmo sendo identificada pela primeira vez induzindo necrose hemorrágica em cânceres experimentais, as evidências que relacionam inflamação e câncer mostram que o TNF- $\alpha$  também tem um papel promotor (BALKWILL, 2009; QU et al, 2018). A ativação do Fator Nuclear kappa B (NF $\kappa$ B) induzida pelo TNF- $\alpha$  ativa vias de indução e promoção do câncer, em estudo com células epidérmicas JB6 de camundongo, o tratamento com TNF- $\alpha$  aumentou a atividade de NF- $\kappa$ B de uma maneira dose-dependente e a ativação de NF- $\kappa$ B induzida por TNF- $\alpha$  foi essencial para a transformação neoplásica dessas células (HSU et al. 2001).

Além disso, o aumento do TNF- $\alpha$  tem um efeito catabólico direto no músculo esquelético (PATEL, 2017). Reid (2001) demonstrou que a via de sinalização catabólica do TNF- $\alpha$  é induzida pela ativação de outros fatores envolvidos na inflamação, desempenhando um papel na degradação proteica associada à caquexia. Nosso estudo mostrou a modulação desta citocina pró-inflamatória pelo RSV de forma positiva quando comparada com tratamento quimioterápico.

Por outro lado, o aumento da quimiocina MIP-1 $\alpha$  no grupo tratado com RSV em comparação com o controle positivo, sugere regular a inflamação e a resposta imune antitumoral, reduzindo o tamanho do tumor e preservando o tecido muscular. A MIP-1 $\alpha$  tem um papel importante na regulação do *homing* de linfonodos e células dendríticas no sítio tumoral, induzindo a respostas de células T antígeno específicas, determinante para resposta imune antitumoral (SCHALLER et al. 2017).

Diante dos resultados sobre as citocinas, foi avaliado se o sFasL, no perfil inflamatório, reflete na preservação do tecido normal e/ou destruição do tecido tumoral. O sFasL é uma molécula solúvel que induz a apoptose de células imunes associadas ao escape do tumor. Tem sido proposto que as células cancerígenas que expressam sFasL têm uma vantagem para escapar da vigilância imunológica induzindo apoptose nos linfócitos infiltrantes que expressam Fas (AKHMEDKHANOV et al., 2003).

Os dados mostraram que os níveis de sFasL no grupo com tumor sem tratamento (CTL) foram maiores que nos grupos tratados com ciclofosfamida e/ou RSV, sugerindo uma relação direta do sFasL e a presença do tumor. Um estudo com linfoma não-Hodgkin mostrou que o nível do sFasL pode ser útil como um marcador da progressão da doença. Pode também ser importante para a previsão do prognóstico clínico, uma vez que o sFasL pode contribuir não apenas para o dano tecidual, mas também para o privilégio imunológico do tumor (KANDA et al., 1999).

Entretanto o comportamento do sFasL sérico em pacientes com câncer é controverso. Enjoji et al. (2004) mostraram que os níveis de sFasL não eram detectáveis em pacientes com carcinoma biliar. Já Murakami et al. (2004) mostrou os níveis séricos de sFasL foram significativamente menores em pacientes com carcinoma biliar do que em indivíduos saudáveis.

Destaca-se que este é o primeiro trabalho que mostra a relação da forma solúvel do FasL (sFasL) com o tumor sólido de Ehrlich. Apesar de não existir estudos com RSV como tratamento do Tumor de Ehrlich com caquexia, Akabatake (2005) mostrou aumento dos níveis circulantes de sFasL em pacientes caquéticos com doença pulmonar crônica em comparação com pacientes saudáveis, sugerindo que o mesmo ocorre no tumor de Ehrlich. O efeito do RSV reduziu o desenvolvimento do tumor e manteve o tecido muscular, podendo indicar que o efeito na modulação inflamatória e na redução dos sFasL podem ser sinérgicos. Diferente do que ocorreu com a ciclofosfamida que reduziu o sFasL, mas intensificou a inflamação, causando redução do tumor com perda da massa muscular, os resultados revelam a importância da modulação da inflamação na caquexia muscular.

A partir desses resultados, como uma avaliação complementar, foi determinado a citotoxicidade (LDH) e a hepatotoxicidade (TGO e TGP).

O grupo com tumor de Ehrlich e a ciclofosfamida mostraram aumento do LDH sugerindo um maior dano tecidual em comparação ao tratado com RSV. O lactato desidrogenase (LDH) se refere a outro marcador de morte celular, sendo uma enzima que está presente em quase todos os tecidos do nosso corpo, ela participa do processo de produção de energia, mas sua dosagem elevada pode indicar a existência de uma severidade aguda e danos teciduais (GALLO et al., 2015, JIA et al., 2018).

Bilir et al (2015) avaliaram a relação entre alguns parâmetros e a sobrevida global mediana em pacientes com caquexia associada ao câncer, mostrando um aumento da LDH no grupo com caquexia. Outro estudo demonstrou a elevação da LDH como um marcador de imunossupressão no câncer, mostrando que a elevação é um prenúncio de resultados negativos em neoplasias sólidas (DING, 2017). Sendo assim, de acordo com nosso estudo, o RSV mostrou um efeito positivo em proteção dos danos teciduais quando correlacionado com outros resultados e com o controle negativo e positivo.

Os resultados das concentrações plasmáticas das enzimas TGO e TGP estavam maiores nos grupos tratados com Ciclofosfamida. Os resultados sugerem que a ciclofosfamida pode ter

gerado lesões dos hepatócitos por ser um quimioterápico de grandes repercussões sistêmicas. As lesões hepáticas associadas ao uso de quimioterápicos abrangem desde alterações bioquímicas e estruturais adaptativas até lesão morfológica com danos muitas vezes irreversíveis do metabolismo ou da estrutura celular (BONASSA, 2005). Um dos efeitos colaterais dos quimioterápicos é a hepatotoxicidade, a qual é diagnosticada através da elevação transitória das enzimas hepáticas (TGO, TGP) durante o tratamento. (BRASIL, 2002). Observamos que o quimioterápico em nosso estudo para tratamento do tumor sólido de Erlich ofereceu risco a função hepática, colaborando com a literatura. Em contrapartida o RSV não aumentou o TGO e TGP, sugerindo que não houve hepatotoxicidade.

A etiologia da caquexia do câncer é multifatorial e, portanto, as muitas moléculas envolvidas no processo de desgaste representam vários candidatos a biomarcadores de caquexia. Violato et al (2014) demonstrou que animais desenvolviam caquexia com 14 dias pela perda de gordura, aumento de triglicédeos, ácidos graxos livres, albumina, diminuição do glicogênio, hipoinsulinemia e hipoglicemia. Diante disso, estudamos o tumor de Ehrlich no modelo de caquexia, avaliando os mecanismos de desenvolvimento do tumor pela concentração de sFasL, evitando a imunidade hospedeiro de trabalhar contra o tumor, com isso, a resposta tumoral potencializava a inflamação que causou prejuízos para o tecido muscular.

Por fim, o RSV mostrou-se uma alternativa positiva para tratamento no modelo sólido de tumor de Ehrlich, sendo uma ferramenta promissora de potencial terapêutico associada as terapias já feitas na caquexia do câncer.

## 7 CONCLUSÃO

Diante dos resultados expostos podemos concluir que:

- O tumor solido de Ehrlich realmente é um modelo promissor para estudar a caquexia neoplásica;
- Que o tratamento com RSV mostrou-se eficiente na redução da carga tumoral;
- Que o tratamento com RSV foi tão eficiente quanto a terapia padrão, entretanto ele mostrou-se menos supressor da celularidade de órgãos linfoides, modulando a resposta inflamatória;
- O trabalho propõe como mecanismo de escape do tumor de Ehrlich da resposta imune do hospedeiro através da liberação de sFasL.
- E pode ser um excelente tratamento para melhorar as condições de desgaste muscular na caquexia oncológica.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUSTSSON T, RYDÉN M, HOFFSTEDT J, HARMELEN V, DICKER A, LAURENCIKIENE J, et al. Mechanism of increased lipolysis in cancer cachexia. *Cancer Res*, 67:5531–5537: 2007.

ALARCON DE LA LASTRA C, VILLEGAS I: Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications. *Biochem Soc Trans*, 35:1156–1160: 2007.

ARAÚJO MJ, DUTRA RP, COSTA GC, REIS AS, ASSUNÇÃO AKM, LIBÉRIO SA, et al. Efeito do tratamento com própolis de *Scaptotrigona aff.* Postiça sobre o desenvolvimento do tumor de Ehrlich em camundongos. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 20; 4: 580-587: 2010.

ARAÚJO MJAM, DUTRA RP, COSTA GC, REIS AS, ASSUNÇÃO AKM, LIBÉRIO SA, MACIEL MCG, SILVA LA, GUERRA RNM, RIBEIRO MNS, NASCIMENTO FRF. Efeito do tratamento com própolis de *Scaptotrigona aff.* postica sobre o desenvolvimento do tumor de Ehrlich em camundongos. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 20: 580-587; 2010.

ATHERTON PJ, GREENHAFF PL, PHILLIPS SM, BODINE SC, ADAMS CM, LANG CH. Controle da atrofia do músculo esquelético em resposta ao desuso: afirmações clínicas / pré-clínicas e falácias de evidências . *Sou. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 311 : 594 – 604: 2016.

AVERSA Z, BELLANTONE R, BOSSOLA M, FANELLI FR, MUSCARITOLI M. Prevention and treatment of câncer cachexia: new insights into an old problem. *Eur J Cancer*, 42:31-41:2006.

AZIZ MA, SERYA RA, LASHEEN DS, ABDEL-AZIZ AK, ESMAT A, MANSOUR AM, ET AL. Discovery of potent VEGFR-2 inhibitors based on Furoprimidine and Thienopyrimidne scaffolds as cancer targeting agents, *Sci. Report*, 6; 24460: 2016.

BAI Y, MAO QQ, QIN J, ZHENG XY, WANG YB, YANG K, ET AL. Resveratrol induces apoptosis and cell cycle arrest of human T24 bladder cancer cells in vitro and inhibits tumor growth in vivo. *Cancer Sci*, 101, 488–493: 2010.

BALKWILL F, MANTOVANI A. Inflammation and cancer: back to Virchow?. *Lancet*,17;357(9255):539-45: 2001.

BALKWILL, F. "Tumour necrosis factor and cancer." *Nature reviews cancer* 9.5; 361-371: 2009.

BARAKAT W, ELSHAZLY SM, MAHMOUD AA. *Spirulina platensis* lacks antitumor effect against solid Ehrlich carcinoma in female mice, *Adv. Pharmacol. Sci*, 132873: 2015.

BATISTA ML, PERES SB, MCDONALD ME, ALCANTARA PS, OLIVAN M, OTOCH JP, et al. Adipose tissue inflammation and cancer cachexia: Possible role of nuclear transcription factors. *Cytokine*, 57 (1):9-16, 2012.

BAUR JA & SINCLAIR DA. The therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat Rev Drug Discov*, 5(6):493-506:2006.

BENNANI-BAITIN & WALSH D. Animal models of the cancer anorexia–cachexia syndrome. *Supp. C. Canc*, 19(9):1451-63, 2010.

BENNETT BT, MOHAMED JS, ALWAY SE. Efeitos do resveratrol na recuperação da massa muscular após desuso no músculo plantar de ratos idosos . *PLoS ONE* . 2013; 8 : e83518.

BHAT KP, LANTVIT D, CHRISTOV K, MEHTA RG, MOON RC, PEZZUTO JM. Estrogenic and antiestrogenic properties of resveratrol in mammary tumor models. *Cancer Res*, 61:7456-7463: 2011.

BHATTACHARJEE A, BASU A, BISWAS J, SEN T, BHATTACHARYA S. Chemoprotective and chemosensitizing properties of selenium nanoparticle (Nano-Se) during adjuvant therapy with cyclophosphamide in tumor-bearing mice. *Mol Cell Biochem*, 424:13-33: 2017.

BILIR C, ENGIN H, CAN M, TEMI YB, DEMIRTAS D. The prognostic role of inflammation and hormones in patients with metastatic cancer with cachexia. *Med Oncol*, 1:32:56: 2015.

BISPING G, LEO R, WENNING D, ET AL. Paracrine interactions of basic fibroblast growth factor and interleukin-6 in multiple myeloma. *Blood*, 101(7):2775–2783:2003.

BISPING G, WENNING D, KROPFF M, ET AL. Bortezomib, dexamethasone, and fibroblast growth factor receptor 3-specific tyrosine kinase inhibitor in t(4;14) myeloma. *Clin Cancer Res.*15(2):520–531: 2009.

BONASSA, E.M.A. *Enfermagem em Terapêutica Oncológica*. 3.ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

BONETTO A, AYDOGDU T, JIN X, ET AL. JAK/STAT3 pathway inhibition blocks skeletal muscle wasting downstream of IL-6 and in experimental cancer cachexia. *American journal of physiology Endocrinology and metabolismo*, 3:410–421: 2012.

BONETTO A, AYDOGDU T, KUNZEVITZKY N, ET AL. STAT3 activation in skeletal muscle links muscle wasting and the acute phase response in cancer cachexia. *PloS one*, 7:22538: 2011.

BOSSOLA M, DOGLIETTO GB, PACELLI F, TORTORELLI A. Cancer cachexia: it's time for more clinical trials. *Ann Surg Oncol*, 14(2):276-285: 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. *Ações de enfermagem para o controle do câncer: uma proposta de integração ensino – serviço*. 2.ed. Rio de Janeiro: INCA, 2002.

BREMNES, R. M. et al. The role of tumor-infiltrating lymphocytes in development, progression, and prognosis of non-small cell lung cancer. *J. Thorac. Oncol.*, v. 11, n. 6, p. 789–800, 2016.

BRIERLEY JD , GOSPODAROWICZ MK, WITTEKIND C . *The TNM Classification of Malignant Tumours* 8th edition. <https://www.uicc.org/resources/tnm/publications-resources>. <acesso em:28/06/201> 2016.

BRITO, M. K. M. et al. Dimensões geométricas das fibras do músculo sóleo de ratos exercitados em esteira rolante: a importância da análise por meio de imagens digitalizadas. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*, Niterói, 12;2;103-107: 2006.

BURKE H. Outcome Prediction and the Future of the TNM Staging System JNCI: Journal of the National Cancer Institute, 96 (19) 6:1408–1409: 2004.

CAILLET P, LIUU E, SIMON AR, BONNEFOY M, GUERIN O, BERRUT G, ET AL. Association between cachexia, chemotherapy and outcomes in older cancer patients: A systematic review. Clin Nutrition, 8:1-10: 2016.

CASATI MZ, ALGAYER C, CARDOSO DA CRUZ G, RIBEIRO FV, CASARIN RC, PIMENTEL SP, et al. Resveratrol decreases periodontal breakdown and modulates local levels of cytokines during periodontitis in rats. J Periodontol, 84(10):58-64: 2013.

CHARGÉ SBP, RUDNICK MA. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. Physiol Rev 84: 209-238: 2004.

CHEN, D. S.; MELLMAN, I. Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. Nature.,18;541(7637):321-330, 2017.

COUSSENS LM, WERB Z. Inflammation and cancer. Nature, 19-26;420:860-7:2002.

DAGLI MLZ, GUERRA JL, SALDIVA PHN. An experimental study on the lymphatic dissemination of the solid Ehrlich tumor in mice. Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci., v.29, p.97-103, 1992.

DANTAS JA, AMBIEL CR, CUMAN RKN, BARONI S, AMADO CAB, Valores de referência de alguns parâmetros fisiológicos de ratos do Biotério central da Universidade Estadual de Maringá, estado do Paraná, Acta Sci. Health Sci , 28(2)165-170: 2006.

DEWS WD, BEGG C, LAVIN PT, BAND PR, BENETT JM, BERTINO JR, et al. Prognostic effect of weight loss prior to chemotherapy in cancer patients Am J Med, 69:491-497:1980.

DEWS WD. Pathophysiology of cancer cachexia: Current understanding and areas for future research. Cancer Res, 42:721-726: 1982.

DING J, KARP JE, EMADI A. Elevated lactate dehydrogenase (LDH) can be a marker of immune suppression in cancer: Interplay between hematologic and solid neoplastic clones and their microenvironments. *Cancer Biomark*, 4:353-363: 2017.

DIRKS NAYLOR AJ. Cellular effects of resveratrol in skeletal muscle. *Life Sci*, 84:637–640;2009.

ENJOJI M, YAMAGUCHI K, NAKASHIMA M, OHTA S, KOTOH K, FUKUSHIMA M, ET AL. Serum levels of soluble molecules associated with evasion of immune surveillance: a study in biliary disease. *Liver Int*; 24: 330–4: 2004.

FEARON K, STRASSER F, ANKER SD, BOSAEUS I, BRUERA E, FAINSINGER RL, et al. Definition and classification of cancer cachexia: an international consensus. *Lancet Onco*, 5:489-95:2011.

FELLER, L.; ALTINI, M.; LEMMER, J. Inflammation in the context of oral cancer. *OralOncol.*, v. 49, n. 9, p. 887–892, 2013.

FINN, O. J. Immuno-oncology: understanding the function and dysfunction of the immune system in cancer. *Annals of Oncology*, 23(8); 6-9, 2012.

FORTES TS, FIALHO EMS, REIS AS, ASSUNÇÃO AKM, PINHEIRO MT, AZEVEDO APS, BARROQUEIRO ESB, GUERRA RNM, NASCIMENTO FRF. Desenvolvimento do Tumor de Ehrlich em camundongos após incubação in vitro com mesocarpo de babaçu. *Revista Ciências da Saúde*, 11(1): 11-18; 2009.

FORTIN M, VIDEMAN T, GIBBONS LE, BATTIE´ MC. Paraspinal muscle morphology and composition: a 15-yr longitudinal magnetic resonance imaging study. *Med Sci Sports Exerc* 46:893–901:2014.

FRAJACOMO FTT, PADILHA CS, MARINELLO PC, GUARNIER FA, CECCHINI R, DUARTE JA, et al. *Life Sciences.*;162:47-53: 2016.

FRANCINE Z, MARQUES M, MARKUS MA, Morris BJ: Resveratrol: cellular actions of a potent natural chemical that confers a diversity of health benefits. *Int J Biochem Cell Biol*, 41(11):2125–2128; 2009.

FRIDMAN WH, PAGES F, SAUTES-FRIDMAN C, GALON J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer*, 12:298–306: 2012.

FRONTERA, WALTER R., AND JULIEN OCHALA. "Skeletal muscle: a brief review of structure and function." *Calcified tissue international* 96.3: 183-195:2015.

GALLO M, SAPIO L, SPINA A, NAVIGLIO D, CALOGERO A, NAVIGLIO S. Lactic dehydrogenase and cancer: an overview. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 20:1234–1249: 2015.

GANAPATHY S, CHEN Q, SINGH KP, SHANKAR S, SRIVASTAVA RK. Resveratrol enhances antitumor activity of TRAIL in prostate cancer xenografts through activation of FOXO transcription factor. *PLoS ONE*, 5-15627: 2010.

GIGLIO, A. Resistência à quimioterapia: uma revisão para o oncologista. . *Revista da Sociedade Brasileira de Cancerologia* 14, 32 – 38:2001.

GORDON JN, GREEN SR, GOGGIN PM. Cancer cachexia. *Q J Med.*; 98:779-88: 2005

GREENLEE H, UNGER J M, LEBLANC M, RAMSEY S, HERSHMAN D L. Association between body mass index and cancer survival in a pooled analysis of 22 clinical trials. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 26:21–29:2017.

GUERRA JL. Aspectos do processo inflamatório em camundongos portadores de Tumor de Ehrlich. 87 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. USP, São Paulo, SP; 1983.

GUERRA.J.L. Aspectos do processo inflamatório em camundongos portadores do tumor de Ehrlich. *Fitoterapia*, 73;730-733, 2002.

GULLETT NP, HEBBAR G, ZIEGLER TR. Update on clinical trials of growth factors and anabolic steroids in cachexia and wasting. *Am J Clin Nutr*, 91:1143–1147: 2010.

HAEHLING V, ANKER S. Cachexia as a major underestimated and unmet medical need: facts and numbers. *J. Cachexia Sarcopenia Muscle*, 1(1); 1–5 :2010.

HANAHAN D, WEINBERG RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144:646–74: 2011.

HANDOLIAS D, QUINN M, FOO S, MILESHKIN L, GRANT P, DUTU G. Oral cyclophosphamide in recurrent ovarian câncer. *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology*; 2013.

HEYMSFIELD SB, ADAMEK M, GONZALEZ MC, JIA G, THOMAS DM. Assessing skeletal muscle mass: historical overview and state of the art. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 5:9–18: 2014.

HORI YS, KUNO A, HOSODA R, TANNO M, MIURA T, SHIMAMOTO K, HORIO Y. Resveratrol ameliorates muscular pathology in the dystrophic mdx mouse, a model for Duchenne muscular dystrophy. *J Pharmacol Exp Ther*,338:784-94: 2011.

HSU TC, NAIR R, TULSIAN P, CAMALIER CE, HEGAMYER GA, YOUNG MR, et al. Transformation nonresponsive cells owe their resistance to lack of p65/nuclear factor-kappaB activation. *Cancer Res* 61: 4160–4168:2001

HU FW, TSAI LL, YU CH, CHEN PN, CHOU MY, YU CC. Impairment of tumor-initiating stem-like property and reversal of epithelial-mesenchymal transdifferentiation in head and neck cancer by resveratrol treatment. *Mol. Nutr. Food Res*, 56, 1247–1258: 2012.

ICHIKURA T, MAJIMA T, UCHIDA T, OKURA E, OGAWA T, MO-CHIZUKI H. Plasma soluble Fas ligand concentration: decrease in elderly men and increase in patients with gastric carcinoma. *Oncol Rep*, 8: 311–4: 2001.

INCA (2018) Estimativa 2018: Incidência de Câncer no Brasil, INCA (Incidência de Câncer no Brasil), 2018.

JANG, M.; CAI, L.; UDEANI, G.O., SLOWING, K.V. THOMAS, C.F. BEECHER, C.W. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*, v. 275, n. 5297, p. 218-20, 1997.

JAVAN R, HORVATH JJ, CASE LE, AUSTIN S, CORDERI J, DUBROVSKY A, KISHNANI PS, BASHIR MR (2013) Generating color-coded anatomic muscle maps for correlation of quantitative magnetic resonance imaging analysis with clinical examination in neuromuscular disorders. *Muscle Nerve* 48:293–295: 2013.

JIA Z, ZHANG J, WANG Z, ET AL. An explorative analysis of the prognostic value of lactate dehydrogenase for survival and the chemotherapeutic response in patients with advanced triple-negative breast cancer. *Oncotarget*, 9(12):10714–10722: 2018.

JULIENNE CM, DUMAS JF, GOUPILLE C, PINAULT M, BERRI C, COLLIN A, et al. Cancer cachexia is associated with a decrease in skeletal muscle mitochondrial oxidative capacities without alteration of ATP production efficiency. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*, 3;(4);265-275:2012.

JUNG HW, KIM JW, KIM JY, KIM SW, YANG HK, LEE JW, et al. Effect of muscle mass on toxicity and survival in patients with colon cancer undergoing adjuvant chemotherapy. *Support Care Cancer*, 23:687–694: 2015.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. *Histologia básica: texto e atlas*. 12.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. p. 178.

KALRA N, ROY P, PRASAD S, SHUKLA, Y. Resveratrol induces apoptosis involving mitochondrial pathways in mouse skin tumorigenesis. *Life Sci*, 82, 348–358:2008.

KAMINSKI J, LANÇON A, AIRES V, LIMAGNE E, ET AL: Resveratrol initiates differentiation of mouse skeletal muscle-derived C2C12 myoblasts. *Biochem Pharmacol*, 84(10):1251–1259: 2012.

KANDA Y, CHIBA S, TANAKA Y, KAMIM, SAITO T, IZUTSU K, ET AL. Increased serum soluble Fas ligand associated with recurrent B-cell non-Hodgkin's lymphoma after autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Leuk Lymphoma* , 34(5-6):625-8: 1999.

KIM JW, BILUSIC M, HEERY CJ, MADAN RA. Therapeutic cancer vaccines in prostate cancer: the quest for intermediate markers of response. *Cancers (Basel)*, 22; (4);1229-46:2012.

KIZILTAN HŞ, BAYIR AG, YUCESAN G, ERIS AH, İDİN K, KARATOPRAK C, et al. Medical ozone and radiotherapy in a peritoneal, Erlich-ascites, tumor-cell model. *Altern Ther Health Med*, 21(2):24-9:2015.

Klausner RD. The fabric of cancer cell biology-Weaving together the strands. *Cancer Cell*, 1(1):3-10:2002.

KOREANE H, NISHIKAWA, A, IMAMURA K. Mechanisms mediating metabolic abnormalities in livers of Ehrlich ascites tumor-bearing mice. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 412;216-222: 2003.

KRAFT, T. E., D. PARISOTTO, C.; SCHEMPP, T. Efferth Fighting cancer with red wine? Molecular mechanisms of resveratrol. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 49: 782–799, 2009.

KUDOU K, KOMATSU T, NOGAMI J, MAEHARA K, HARADA A, SAEKI H, et al. The requirement of Mettl3-promoted MyoD mRNA maintenance in proliferative myoblasts for skeletal muscle differentiation. *Open Biol*, 9; 170119: 2017.

KUROIWA Y, NISHIKAWA A, KITAMURA Y, KANKI K, ISHII, Y, UMEMURA T, et al. Protective effects of benzyl isothiocyanate and sulforaphane but not resveratrol against initiation of pancreatic carcinogenesis in hamsters. *Cancer Lett*, 241, 275–280: 2006.

LEE HS, HA AW, KIM WK. Effect of resveratrol on the metastasis of 4T1 mouse breast cancer cells in vitro and in vivo. *Nutr. Res. Pract*, 6, 294–300; 2012.

LEE MH, CHOI BY, KUNDU JK, SHIN YK, NA HK, SURH YJ. Resveratrol suppresses growth of human ovarian cancer cells in culture and in a murine xenograft model: Eukaryotic elongation factor 1A2 as a potential target. *Cancer Res.*, 69, 7449–7458: 2009.

LIN B, PODAR K, GUPTA D, ET AL. The vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor PTK787/ZK222584 inhibits growth and migration of multiple myeloma cells in the bone marrow microenvironment. *Cancer Res*, 62(17):5019–5026: 2002.

- LIN HC, CHEN YF, HSU WH, YANG CW, KAO CH, TSAI TF. Resveratrol helps recovery from fatty liver and protects against hepatocellular carcinoma induced by hepatitis B virus X protein in a mouse model. *Cancer Prev. Res.*, 5, 952–962: 2012.
- LIPINSKI, K. A.; BARBER, L. J.; DAVIES, M. N.; ASHENDEN, M.; SOTTORIVA, A. Gerlinger M2. Cancer Evolution and the Limits of Predictability in Precision Cancer Medicine. *Trends Cancer*, 2(1):49-63, 2016.
- LOUMAYE A, THISSEN JP. Biomarkers of cancer cachexia, *Clin Biochem.* 50(18):1281-1288: 2017.
- LOUVEIRO MAP, MASCIO DP, MEDEIROS MHG. Formação de adutos exocíclicos com bases de dna: implicações em mutagênese e carcinogênese. *Quim. Nova*, 25; (5) 777-793:2002.
- LUCH A. Nature and nurture – lessons from chemical carcinogenesis *Nature Reviews Cancervolume*, 5;113–125:2005.
- MADY, E.A. Antitumor and biochemical effects of *Echis coloratus* Crude venom on Ehrlich ascite carcinoma cells in vivo. *J. Venon Anim. Toxins*, 8;283-296:2002.
- MANTOVANI G, MADEDDU C, MACCIÒ A, GRAMIGNANO G, LUSSO MR, MASSA E, et al. Cancer-related anorexia/cachexia syndrome and oxidative stress: an innovative approach beyond current treatment. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 13(10):1651-9:2004.
- MANTOVANI, G.; MADEDDU, C. Cancer cachexia: medical management. *Support. Care Cancer.*; 18:1–9, 2010.
- MARELLI G, HOWELLS A, LEMOINE NR, WANG Y. Oncolytic Viral Therapy and the Immune System: A Double-Edged Sword Against Cancer. *Front Immunol*, 26; 9:866; 2018.
- MATHIEU O, CRUZ-ORIVELM, HOPPELERH, WEIBELER. Measuring error and sampling variation in stereology: comparison of the efficiency of various methods for planar image analysis. *J Microsc*; 121(1): 75-88: 1981.

MATTHYS P & BILLIAU A. Cytokines and cachexia. *Nutrition*, 13(9): 763-70:1997.

MOLDAWER LL, ROGY MA, LOWRY SF. The role of cytokines in cancer cachexia. *JPEN JPparenter Enteral Nutr*, 16(6):43-9:1992.

MONDAL A & BENNETT LL. Resveratrol enhances the efficacy of sorafenib mediated apoptosis in human breast cancer MCF7 cells through ROS, cell cycle inhibition, caspase 3 and PARP cleavage. *Biomed. Pharmacother*, 84:1906–1914: 2016.

MONTESSANO A, LUZI L, SENESI P, MAZZOCCHI N, TERRUZZI I. Resveratrol promotes myogenesis and hypertrophy in murine myoblasts. *11, 310, 2-15*. 2013.

MOSER B, LOETSCHER P. Lymphocyte traffic control by chemokines. *Nat Immunol*, 2(2):123-8: 2001.

MOSMANN T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 65, 2, 55-63. 1983.

MOUAWAD R, KHAYAT D, SOUBRANE C. Plasma Fas ligand, an inducer of apoptosis, and plasma soluble Fas, an inhibitor of apoptosis, in advanced melanoma. *Melanoma Res*, 10: 461–7: 2000.

MUKHERJEE, S., J. I. DUDLEY E D. K. DAS. "Dose-dependency of Resveratrol in providing health benefits." *Dose-Response*, 8(4): 478-500, 2010.

MULLIGAN, K. AND BLOCH. Energy expenditure and protein metabolism in humanan immune deficiency virus infection and cancer caquexia. *Sem. Oncol.*; 25, 82-91, 1998.

MURAKAMI M, SASAKI T, MIYATA H, YAMASAKI S, KU- WAHARA K, CHAYAMA K. Fas and Fas ligand: Expression and soluble circulating levels in bile duct carcinoma. *Oncol Rep*, 11: 1183–6: 2004.

MUSCARITOLI M, ANKER SD, ARGILÉS J, AVERSA Z, BAUER JM, BIOLO G, ET AL. Consensus de nition of sarcopenia, cachexia and pre-cachexia: Joint document elaborated by

Special Interest Groups (SIG) “cachexia-anorexia in chronic wasting diseases” and “nutrition in geriatrics”. *Clin Nutr*, 29:154-9:2010.

NASCIMENTO FRF, CRUZ GVB, PEREIRA PVS, MACIEL MCG SILVA LA, AZEVEDO APS, BARROQUEIRO ESB, GUERRA RNM. Ascitic and solid Ehrlich tumor inhibition by *Chenopodium ambrosioides* L. treatment. *Life Sciences*, 78:2650–2653; 2006.

NASCIMENTO JR. Amplificação da polarização de macrófagos M1 e inibição do desenvolvimento tumoral pelo tratamento com aminoguanidina. 2018.131f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Maranhão (UFMA), São Luís – MA; 2018.

NAWATA T, KUBO M, OKUDA S, OMOTO M, YUJIRI T, KANDA T, YANO M. Successful treatment with intravenous cyclophosphamide for antimelanoma differentiation-associated gene 5 antibody-positive dermatomyositis associated with myelodysplastic syndrome. *Scandinavian Journal of Rheumatology*, 46(6):496-498; 2017.

NERY LHR., Eficácia da dexametasona e da doxorubicina no tumor de Ehrlich transplantado em camundongos BALB/c. 2004, 88f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Viçosa, 2004.

NETO E, ZORN TMT, CURI R, CARPINELLI AR. Impairment of insulin secretion in pancreatic islets isolated from Walker 256 tumor-bearing rats. *Am J Physiol Cell Physiol*, 271:804–809:1996.

NICHOLSON SK, TUCKER GA, BRAMELD JM. Effects of dietary polyphenols on gene expression in human vascular endothelial cells. *Proc Nutr Soc*.67:42–47:2008.

NOGUCHI Y, YOSHIKAWA T, MARAT D, DOI C, MAKINO T, FUKUZAWA K, ET AL. Insulin resistance in cancer patients is associated with enhanced tumor necrosis factor-alpha expression in skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun*, 30;253(3):887-92:1998.

ONUCHIC AC & CHAMMAS R. Câncer e o microambiente tumoral. *Revista De Medicina*, 89(1), 21-31; 2010.

ORSU P, MURTHY BV, AKULA A. Cerebroprotective potential of resveratrol through anti-oxidant and anti-inflammatory mechanisms in rats. *J Neural Transm*, 120(8):1217-23: 2013.

PALERMO-NETO, J.; MASSOCO, C.O.; SOUZA, W.R. Effects of physical and psychological stressors on behaviour, macrophage activity, and Ehrlich tumor growth. *Brain Behav. Immun.*, v.17, p. 43-54, 2003.

PARSONS, H; TELÔMEROS, TELOMERASE E CÂNCER, *Rev. Fac. Ciênc. Méd. Sorocaba*, 5;(1) 54-59: 2003.

PATEL HJ, PATEL BM. TNF- $\alpha$  and cancer cachexia: Molecular insights and clinical implications. *Life Sciences*, 170: 56–63: 2017.

PATEL KR, BROWN VA, JONES DJ, BRITTON RG, HEMINGWAY D, MILLER AS, et al. Clinical pharmacology of resveratrol and its metabolites in colorectal cancer patients. *Cancer Research*, 70: 19;7392-9, 2011.

PERVALZ S & HOLME AL: Resveratrol: its biologic targets and functional ACTIVITY. *Antioxid redox signal*, 11(11):2851–2897:2009.

PETTE D, STARON RS. Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. *Microsc Res Tech* 50: 500-509: 2000.

PHILIP M, ROWLEY DA, SCHREIBER H. Inflammation as a tumor promoter in cancer induction. *Semin Cancer Biol*, 14(6):433-9: 2004.

PRADO CM, BARACOS VE, MCCARGAR LJ, REIMAN T, MOURTZAKIS M, TONKIN K, ET AL. Sarcopenia as a determinant of chemotherapy toxicity and time to tumor progression in metastatic breast cancer patients receiving capecitabine treatment. *Clin Cancer Res*, 15:2920–2926: 2009.

QU, XINGLONG, YING TANG, AND SHUCHENG HUA. "Immunological approaches towards cancer and inflammation: a cross talk." *Frontiers in immunology* 9; 563:2018.

REBECA R, BRACHT L, NOLETO GR, MARTINEZ GR, CADENA SMSC, CARNIERI EGS, et al. Production of cachexia mediators by Walker 256 cells from ascitic tumors. *Cell Biochem Funct*, 26:731–736: 2008.

REID MB, LI YP. Tumor necrosis factor-  $\alpha$  and muscle wasting: a cellular perspective, *Respir Res.*;2:269–272: 2001.

REIS AS. Caracterização histológica, imunofenotípica e produção de citocinas em camundongos portadores de tumor de Ehrlich na forma sólida. 2012. 61F. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Maranhão (UFMA), São Luís – MA; 2012.

REMARK R, ALIFANO M, CREMER I, LUPO A, DIEU-NOSJEAN MC, RIQUET M, ET AL. Characteristics and clinical impacts of the immune environments in colorectal and renal cell carcinoma lung metastases: influence of tumor origin. *Clin Cancer Res*, 19:4079–91: 2013.

ROHM M, ZEIGERER A, MACHADO J, HERZIG S. Energy metabolism in cachexia. *EMBO Reports*,19; 2-13;2019.

SAHIN E, BAYCU C, KOPARAL AT, BURUKOGLU DONMEZ D, BEKTUR E. Resveratrol reduces IL-6 and VEGF secretion from co-cultured A549 lung cancer cells and adipose-derived mesenchymal stem cells. *Tumour Biol.*;6:7573-7582:2016.

SARMA, J. V.; WARD, P. A. The complement system. *Cell Tissue Research*, v. 343, n. 1, p. 227-35, 2011.

SAUD, SM, LI W, MORRIS NL, MATTER MS, COLBURN NH, KIM YS, ET AL. Resveratrol prevents tumorigenesis in mouse model of Kras activated sporadic colorectal cancer by suppressing oncogenic Kras expression. *Carcinogenesis*, 35, 2778–2786: 2014.

SCHALLER, TEILO H., ET AL. "Chemokines as adjuvants for immunotherapy: implications for immune activation with CCL3." *Expert review of clinical immunology* 13.11; 1049-1060:2017. AKHMEDKHANOV A, LUNDIN E, GULLER S, LUKANOVA A, MICHELI A, MA Y, ET AL. Circulating soluble Fas levels and risk of ovarian cancer. *BMC Cancer*, 22;3:33: 2003.

SCHMIDT SF, ROHM M, HERZIG S, BERRIEL-DIAZ M. Cancer Cachexia: More Than Skeletal Muscle Wasting. *Trends in Cancer*, 4:(12) 849-860:2018.

SCHREIBER RD, OLD LJ, SMYTH MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science*, 331:1565–70: 2011.

SEGURA, J. A.; BARBERO, L.G.; MÁRQUEZ, J. Ehrlich ascites tumour unbalances splenic cell populations and reduces responsiveness of T cells to *Staphylococcus aureus* enterotoxin B stimulation. *Immunol. Lett.*, v.74, p.111-115, 2000.

SERRA ICPB. Croton triquetter Lam.: Efeito antitumoral e ativação da imunidade inata. 2016. 168f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), ponto focal: Universidade Federal do Maranhão (UFMA), São Luís – MA; 2016.

SHANMUGAM MK, ARFUSO F, ARUMUGAM S, CHINNATHAMBI A, JINSONG B, WARRIER S, ET AL. Role of novel histone modifications in cancer. *Oncotarget*, 9(13):11414-11426; 2017.

SHUKLA, Y.; SINGH, R. Resveratrol and cellular mechanisms of cancer prevention. *Ann N Y Acad Sci.*, 1215:1-8, 2011.

SILVA MPN. Síndrome da anorexia-caquexia em portadores de câncer. *Revista brasileira de cancerologia*. 52:19: 2008.

SILVA, A. E.; SANTOS, F. G. A.; CASSALI, G. D.; Marcadores de proliferação na avaliação do crescimento do tumor sólido e ascítico de Ehrlich, *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 58;(4); 658-661: 2006.

SILVA, A.E. Efeito do hipotireoidismo no tumor de Ehrlich na deficiência ou suficiência dos esteróides sexuais femininos. 85f. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte: 2003

SIM (2009) Dados de declaração de óbito. Brasil. Ministério da Saúde. Departamento de Informação e Informática do SUS. Brasília: DATASUS In, Sistema de informação sobre mortalidade (SIM) 2006-2007.

SIU, L.O.; RUSSEAU, J.C.; TAYLOR, A.W. Determination of glycogen in small tissue samples . *J.Appl. Physiol* . v. 28, n. 2, p. 234-236, 1970.

SOARES-FILHO PR, CASTRO I, STAHLSCHEMIDT A. Efeito do vinho tinto associado ao exercício físico no sistema cardiovascular de ratos espontaneamente hipertensos. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 96(4);277-83: 2011.

STEPHEN E, JEAN L M, KALEN K, AUSTEN V, BENJAMIN F, DIANA LG, et al. Resveratrol Enhances Exercise-Induced Cellular and Functional Adaptations of Skeletal Muscle in Older Men and Women. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 72(12): 1595–1606:2017.

STEWART, H.L. (Ed.). *Transplantable and transmissible tumors of animals*. Washington, D.C.: Armed Force Institute of Pathology, 378: 1959.

SVAJGER U, JERAS M. Anti-inflammatory effects of resveratrol and its potential use in therapy of immune-mediated diseases. *International Reviews of Immunology*, 31, 202–22, 2012.

SZATROWSKI TP, NATHAN CF. Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer Res*, 51:794–798: 1991.

TANAKA Y, ADAMS DH, HUBSCHER S, HIRANO H. Siebenlist, and S. Shaw. T-cell adhesion induced by proteoglycan-immobilized cytokine MIP-1B. *Nature*, 361:79: 1993.

TEMEL JS, GREER JA, MUZIKANSKY A, ET AL. Early palliative care for patients with metastatic non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*, 363:733-742: 2010.

TENG MW, GALON J, FRIDMAN WH, SMYTH MJ. From mice to humans: developments in cancer immunoediting. *J Clin Invest*, 125:3338–46: 2015.

TISDALE, M. J. Mechanisms of cancer cachexia. *Physiol. Rev*, 89: 381-410, 2009.

- TISDALE, M. J. Molecular pathways leading to cancer. *Physiol.* 20: 340-348, 2005.
- TISDALE, M. J. The 'cancer cachectic factor'. *Support. Care Cancer*, 11(2):73-8, 2003.
- TISDALE, M.J. Cachexia in cancer patients. *Nat Rev Cancer*, 2; 862–871: 2002.
- TROVATO, FRANCESCA MARIA, ET AL. "Morphological and functional aspects of human skeletal muscle." *Journal of Functional Morphology and Kinesiology* 1.3: 289-302:2016.
- VAGNILDHAUG OM, BALSTAD TR, ALMBERG SS, BRUNELLI C, KNUDSEN AK, KAASA S, ET AL. A cross-sectional study examining the prevalence of cachexia and areas of unmet need in patients with câncer. *Support Care Cancer*, 26:1871-1880: 2018.
- VALKO M, RHODES CJ, MONCO J, IZAKOVIC M, MAZUR M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological interactions*, 160; 1-40:2006.
- VIOLATO, N.M.; RAFACHO, A.; BOSCHERO, A.C.; BOSQUEIRO, J.R. Higher insulin sensitivity and impaired insulin secretion in cachectic solid ehrlich tumour-bearing. *Hormone and Metabolic Research*, 46; 6; 615-620, 2014.
- VON HAEHLING S, ANKER SD. Cachexia as a major underestimated and unmet medical need: facts and numbers. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, 5;1:1: 2010.
- WANG JM, DENG X, GONG W, SU S. Chemokines and their role in tumor growth and metastasis. *J Immunol Methods*, 1;220(1-2):1-17:1998.
- WANG, Y.; ROMIGH, T.; HE, X.; ORLOFF, M. S.; SILVERMAN, R. H.; HESTON, W. D.; ENG, C. Resveratrol regulates the PTEN/AKT pathway through androgen receptor-dependent and –independent mechanisms in prostate cancer cell lines. *Human Molecular Genetics*, 19 (22):4319-29, 2010.
- WEYERMANN P, DALLMANN R, MAGYAR J, ANKLIN C, HUFSCHMID M, DUBACH-POWELL J, et al. Orally Available Selective Melanocortin-4 Receptor Antagonists Stimulate Food Intake and Reduce Cancer-Induced Cachexia in Mice. *P. One*, 4; (3): 4774: 2009.

WHITE JP, PUPPA MJ, GAO S, ET AL. Muscle mTORC1 suppression by IL-6 during cancer cachexia: a role for AMPK. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*, 10:1042–1052: 2013.

WHITE JP, PUPPA MJ, NARSALE A, ET AL. Characterization of the male *ApcMin/+* mouse as a hypogonadism model related to cancer cachexia. *Biol Open.*;12:1346–1353: 2013.

WHO - World Health Organization, 2017. World' shealthministersrenewcommitmenttocancerpreventionandcontrol. Disponível em: <<http://www.who.int/cancer/media/news/cancer-prevention-resolution/en>> Acesso em: jun de 2018.

WITTEKIND CH, ASAMURA, SOBIN LH. *TNM classification of malignant tumours*. 6th Edition: 2014.

WOLFE RR (2006) The underappreciated role of muscle in health and disease. *Am J Clin Nutr* 84:475–482: 2006.

XUZHU G, KOMAI-KOMA M, LEUNG BP, ET AL. Resveratrol modulates murine collageninduced arthritis by inhibiting Th17 and B-cell function. *Ann Rheum Dis*, 71:129-135:2012.

YEAGLEY D. Endotoxin-Induced IL-6 Promoter Activation in Skeletal Muscle Requires an NF- $\kappa$ B Site. *Int J Infereron. Cytokine Mediator Res*, 2;9-21:2010.

YOUNES RN & NOGUCHI Y. Pathophysiology of cancer cachexia. *Rev. Hosp. Clin*, 55;(5):181-193: 2000.

YOUSEF M, VLACHOGIANNIS IA, TSIANI E. Effects of Resveratrol against Lung Cancer: In Vitro and In Vivo Studies. 10;9(11): 2017.

ZHOU HB, CHEN J, WANG WX, CAI JT, DU Q. Anticancer activity of resveratrol on implanted human primary gastric carcinoma cells in nude mice. *World J. Gastroenterol*, 11, 280–284: 2005.

## 9 ANEXO

## ANEXO 1

Revista: *International Journal of Development Research*

 ISSN: 2230-9926	Available online at <a href="http://www.journalijdr.com">http://www.journalijdr.com</a>  <i>International Journal of Development Research</i> Vol. 11, Issue, 03, pp.45058-45061, March, 2021 <a href="https://doi.org/10.37118/ijdr.21313.03.2021">https://doi.org/10.37118/ijdr.21313.03.2021</a>	
<b>RESEARCH ARTICLE</b>	<b>OPEN ACCESS</b>	
<h2 style="margin: 0;">EFFECTS OF RESVERATROL ON TUMOR IMMUNITY: REVIEW</h2> <p style="margin: 0;"><b>*Elis Cabral Victor, Leticia Prince Pereira Pontes and Ana Paula Silva de Azevedo dos Santos</b></p> <p style="margin: 0;">Laboratory of Cancer Immunology Applied - Federal University of Maranhão, Brazil</p>		
<p><b>ARTICLE INFO</b></p> <hr/> <p><i>Article History:</i>          Received 19<sup>th</sup> December, 2020          Received in revised form          24<sup>th</sup> January, 2021          Accepted 14<sup>th</sup> February, 2021          Published online 15<sup>th</sup> March, 2021</p> <hr/> <p><i>Key Words:</i>          Cancer, Resveratrol,          Immune System.</p> <hr/> <p><i>*Corresponding author: Elis Cabral Victor</i></p>	<p><b>ABSTRACT</b></p> <hr/> <p>The purpose of this review was to relate functional aspects of the immune system to cancer and verify if the use of resveratrol may present any adjuvant strategy. The immune system protects the human body against aggressive agents and presents a complex and integrative form of action involving different immune cells. In the neoplastic context, conventional treatment by chemotherapy and radiotherapy generates many side effects. In the neoplastic context, defective cells that are not recognized by immune system and the conventional treatment by chemotherapy and radiotherapy generates relevant collateral effects. Resveratrol has been described as an important immunomodulator. Thus, we raise the following question: if resveratrol can be used as a coadjuvant on cancer treatment?</p>	
<p><small>Copyright © 2021, Elis Cabral Victor et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.</small></p>		
<p><small>Citation: Elis Cabral Victor, Leticia Prince Pereira Pontes and Ana Paula Silva de Azevedo dos Santos. "Effects of Resveratrol on Tumor Immunity: Review", <i>International Journal of Development Research</i>, 11, (03), 45058-45061.</small></p>		
<p><b>INTRODUCTION</b></p> <p>Cancer has been consolidated as a global public health problem (REBECCA, 2017), revealing itself as the second-highest frequency of incidence, frequency of diagnosis and death. Due to the intensive</p>	<p>There are three traditional forms of cancer treatment: surgery, radiotherapy and chemotherapy (INCA, 2020). However, despite the efficacy of the related treatments, these therapeutic modalities also promote several adverse effects, including myelosuppression, nausea, vomiting, diarrhea and alopecia. Due to these collateral effects, there</p>	

## ANEXO 2

Revista: *Photobiomodulation, Photomedicine, and Laser Surgery*

## Effect of Photobiomodulation in Lipopolysaccharide-Treated Myoblasts

Eli Cabral Victor, MS,<sup>1</sup> Juliana Goulardins, PhD,<sup>1</sup> Vinicius Oliveira Cardoso, MS,<sup>1</sup>  
 Renata Elen Costa Silva, BS,<sup>2</sup> Aldo Brugnara Junior, DDS, PhD,<sup>3</sup> Sandra Kaili Bussadori, DDS, PhD,<sup>1,4</sup>  
 Kristianne Porta Santos Fernandes, DDS, PhD,<sup>1</sup> and Raquel Agnelli Mesquita-Ferrari, PhD<sup>1,4</sup>

### Abstract

**Objective:** To evaluate the effect of photobiomodulation (PBM) on cell viability, synthesis of nitric oxide (NO), and interleukin (IL)-6 inflammatory cytokine production in myoblasts cultured in the presence of lipopolysaccharides (LPSs).

**Methods:** C2C12 myoblasts were treated with LPS and PBM using different parameters (wavelength: 780nm; beam spot: 0.04 cm<sup>2</sup>; power output: 10 or 40mW; energy density: 5 or 20 J/cm<sup>2</sup>; and 20-sec exposure time). Nonirradiated cells were used to the control group.

**Results:** An increase in cell viability was found in both LPS groups in comparison with the control. PBM with the higher power output (40mW) induced a reduction in cell viability. PBM also modulated the synthesis of NO in the myoblasts, but did not alter the expression of IL-6.

**Conclusions:** Based on these findings, PBM is capable of modulating the cell viability and the production of NO in LPS-treated myoblasts and it is, therefore, a possible tool for the treatment of muscle injury caused by infection.

**Keywords:** cell biology, nitric oxide, muscle cells, inflammation, photobiomodulation, C2C12

### Introduction

**S**KELETAL MUSCLE TISSUE has a high capacity to repair following different types of lesion, including mechanical trauma, thermal stress, myotoxic agents, ischemia, neurological damage, and in other lesions originating from inflammatory processes caused by infection.<sup>1–3</sup> Further, some diseases and conditions also cause an involvement and damage of skeletal muscle, including cancer, sepsis, burn injury, heart failure, and AIDS.<sup>4</sup> The muscle regeneration, including the situations that require the muscle mass maintenance, is mediated by muscle stem cells called satellite cells (SCs) that are located between the sarcolemma and basal lamina of the muscle fiber and are maintained in a state of quiescence under basal conditions.<sup>2,5,6</sup> After an injury, the SCs become activated and start to migrate to the injury site, proliferate, differentiate, and fuse to restore the muscle architecture.<sup>3,7–9</sup> During all stages of proliferation and differentiation, the SCs express myogenic factors, that is,

transcription factors of myogenic lineage Myf5, MyoD, myogenin, and Myf4,<sup>10,11</sup> and cytokines important for muscle regeneration, which are also secreted by inflammatory cells, such as monocytes and macrophages.<sup>1</sup>

Considering the sepsis and infections condition, lipopolysaccharide (LPS) has an important role since is the prevalent pathogenic molecule that is found on the surface of gram-negative bacteria and is regularly inhaled and ingested.<sup>3,7</sup> LPS is one of the most potent innate immune-activating stimuli known, and induces the release of cytokines produced by human monocytes and macrophages, including tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), the interleukin (IL)-1 family, IL-6, IL-8, the IL-10 family, the IL-12 family, IL-15, and transforming growth factor  $\beta$ .<sup>12</sup> Elevated levels of TNF- $\alpha$  and IL-6 are related to protein degradation in muscle tissue and consequent muscle weakness.<sup>3</sup>

The photobiomodulation (PBM) has been demonstrated positive effects in skeletal muscle repair after different injury or damage conditions. Studies in the literature show

<sup>1</sup>Postgraduate Program in Biophotonics Applied to Health Sciences, Universidade Nove de Julho (UNINOVE), São Paulo, Brazil.

<sup>2</sup>Biomedicine undergraduate course, Universidade Nove de Julho (UNINOVE), São Paulo, Brazil.

<sup>3</sup>Biomedical Engineer Research Center (CER), Universidade Católica Castelo Branco, São José dos Campos, Brazil.

<sup>4</sup>Postgraduate Program in Rehabilitation Sciences, Universidade Nove de Julho (UNINOVE), São Paulo, Brazil.



ISSN: 2230-9926

Available online at <http://www.journalijdr.com>

IJDR

International Journal of Development Research  
Vol. 10, Issue, 03, pp. 34868-34872, March, 2020

RESEARCH ARTICLE

OPEN ACCESS

## EVALUATION OF DEATHS FROM EXTERNAL CAUSES IN A STATE IN BRAZIL

Elis Cabral Victor<sup>1\*</sup>, Alessandro Guimarães Reis<sup>2</sup>, Arissane de Sousa Falcão<sup>3</sup>, Flávia Ferreira Monari<sup>4</sup>, Pablo Lisandro Tavares dos Santos Moraes<sup>5</sup>, Enrico Capone<sup>6</sup>, Nayana Nazaré Pessoa Sousa Ximenes<sup>7</sup>, Ester dos Santos de Souza<sup>8</sup>, Hylla Caroline Dávila Sá<sup>9</sup>, Paloma Ricardo Nascimento Jardim<sup>10</sup>, André dos Santos Neves<sup>11</sup>, Dilvanir Gusmão Silva<sup>12</sup>, Selma Gomes Samineses<sup>13</sup>, Giselle Cutrim de Oliveira Santos<sup>14</sup>, Nelmar de Oliveira Mendes<sup>15</sup>, Viviane de Jesus Silva Salvino<sup>16</sup>, Marlon Lemos de Araújo<sup>17</sup> and Viviane Sousa Ferreira<sup>18</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal do Maranhão – São Luís-MA, <sup>2</sup>Hospital Socorrão I – São Luís - MA, <sup>3</sup>Universidade Federal do Maranhão – Imperatriz-MA, <sup>4</sup>Universidade Federal do Maranhão – Imperatriz - MA, <sup>5</sup>Universidade Federal do Maranhão, <sup>6</sup>Università Degli Studi di Salerno, <sup>7</sup>Faculdade Estácio de Sá – São Luís-MA, <sup>8</sup>UNINASSAU – São Luís, <sup>9</sup>UNINASSAU – São Luís, <sup>10</sup>UNINASSAU – São Luís, <sup>11</sup>UNINASSAU – São Luís, <sup>12</sup>Hospital Odorico Amaral de Matos, <sup>13</sup>Centro Especializado de Reabilitação do Olho D'água, São Luís – MA, <sup>14</sup>Universidade Federal do Maranhão, <sup>15</sup>UNINASSAU- São Luís, <sup>16</sup>Hospital Odorico Amaral de Matos, <sup>17</sup>Universidade Federal do Maranhão – São Luís, <sup>18</sup>Universidade Federal do Maranhão – São Luís - MA

## ARTICLE INFO

## Article History:

Received 06<sup>th</sup> December, 2019  
Received in revised form  
18<sup>th</sup> January, 2020  
Accepted 28<sup>th</sup> February, 2020  
Published online 31<sup>st</sup> March, 2020

## Key Words:

Epidemiological factors<sup>1</sup>, External causes<sup>2</sup>,  
Death<sup>3</sup>.

\*Corresponding author: Elis Cabral Victor,

## ABSTRACT

**Introduction:** In the last century, infectious diseases were the main cause of death in Brazil and in the world, currently external causes are one of the major public health concerns. The present study aimed to assess deaths from external causes in a Brazilian state. **Materials and methods:** This is a retrospective descriptive comparative epidemiological study, using national databases from the Brazilian Institute of Geography and Statistics (IBGE) and the SUS Department of Informatics (DATASUS) from 2010 to 2017. **Results:** It was observed whereas in the state of Maranhão, deaths from external causes have increased over the years, aggressions are the main cause of death from external causes with 42% of the total, the age group of 80 years or more is the most susceptible with 15.44 per 1,000 inhabitants assessing each year of the study and men have a higher mortality rate compared to women. **Conclusion:** the results of the present study expose the heterogeneity of the indicator, suggesting that it is essential that health authorities are attentive to all these social determinants so that they can formulate public policies to the satisfaction of the specificity of their population.

Copyright © 2020, Elis Cabral Victor et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Citation: Elis Cabral Victor, Alessandro Guimarães Reis, Arissane de Sousa Falcão, et al. 2020. "Evaluation of deaths from external causes in a state in Brazil", International Journal of Development Research, 10, (03), 34868-34872.