



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: FISILOGIA E  
FARMACOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA E BIOFÍSICA

FILIPE ALEX DA SILVA

**INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL EFEITO ANTITUMORAL E  
ANTICAQUÉTICO DA ALAMANDINA EM MODELO DE MELANOMA MURINO**

Belo Horizonte

2022

Filipe Alex da Silva

**INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL EFEITO ANTITUMORAL E  
ANTICAQUÉTICO DA ALAMANDINA EM MODELO DE MELANOMA MURINO**

**Versão Final**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas/ Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de doutor em Fisiologia.

Orientador: Prof. Dr. Robson A. Souza dos Santos

Área de concentração: Fisiologia

Belo Horizonte

2022

043

Silva, Filipe Alex da.

Investigação do potencial efeito antitumoral e anticaquético da Alamandina em modelo de melanoma murinho [manuscrito] / Filipe Alex da Silva. – 2022.  
80 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Robson A. Souza dos Santos.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia.

1. Fisiologia. 2. Neoplasias. 3. Melanoma. 4. Caquexia. 5. Sistema Renina-Angiotensina. I. Santos, Robson Augusto Souza dos. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 612



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA**

**ATA DA DEFESA DA TESE N° 357 DE FILIPPE ALEX DA SILVA**

Às 09:00 horas do dia **23 do mês de fevereiro de 2022**, transmitida através de webconferência pela plataforma Zoom, realizou-se a sessão pública para a defesa da Tese de **Filipe Alex da Silva**. A presidência da sessão coube ao **Prof. Dr. Robson Augusto Souza dos Santos**, orientador. Inicialmente, o presidente fez a apresentação da Comissão Examinadora assim constituída: **Profa. Dra. Elaine Maria de Souza Fagundes**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, **Prof. Dr. Almir de Sousa Martins**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, **Profa. Dra. Andréia Carvalho Alzamora**, ICEB/Universidade Federal de Ouro Preto, **Prof. Dr. Roberto Queiroga Lautner**, DCBV/Universidade Federal de Juiz de Fora, e **Prof. Dr. Robson Augusto Souza dos Santos**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, orientador. Em seguida, o candidato fez a apresentação do trabalho que constitui sua **Tese de Doutorado**, intitulada: "**Investigação do Potencial Efeito Antitumoral e Anticaquético da Alamandina Em Modelo de Melanoma Murino**". Seguiu-se a arguição pelos examinadores e logo após, a Comissão reuniu-se, sem a presença do candidato e do público e decidiu considerar **APROVADA** a Tese de Doutorado. O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ata que, depois de lida, se aprovada, será assinada pela Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 23 de fevereiro de 2022.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Almir de Sousa Martins, Membro de comissão**, em 04/03/2022, às 19:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Elaine Maria de Souza Fagundes, Professora do Magistério Superior**, em 07/03/2022, às 07:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Roberto Queiroga Lautner, Usuário Externo**, em 07/03/2022, às 11:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Robson Augusto Souza dos Santos, Professor do Magistério Superior**, em 16/03/2022, às 10:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Andreia Carvalho Alzamora, Usuário Externo**, em 12/04/2022, às 09:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1287620** e o código CRC **91A6AC3E**.

## AGRADECIMENTOS

*A Deus e a espiritualidade amiga que mesmo nos momentos de fraqueza e desânimo nunca me faltaram como fonte de coragem, alívio e perseverança.*

*Aos meus pais que deste sempre focaram todos seus esforços na formação dos filhos e nunca hesitaram um segundo em apoiar cada decisão.*

*A minha avó, irmã e demais familiares que sempre torceram por mim e as sobrinhas Yasmin, Isis e Lívia que trouxeram muita felicidade pra toda a família.*

*A todas as pessoas especiais que tive o prazer de conhecer e mesmo com a distância não deixaram de estar presentes. Principalmente a Nádia, Miriam, Tábatta, Val e Marcos pela amizade de quase vinte anos.*

*Ao meu orientador Robson Santos pela confiança a mim creditada, pelo exemplo e referência de um grande mestre e pesquisador.*

*A todos os colegas e amigos do laboratório Hipertensão, especialmente aos que estiveram mais presentes durante meu período no laboratório durante o doutorado: Cristiane, Sthefanie, Ana Carolina, Lucas Rodrigues, Lucas Bolais, Héric, Filipi, Edneia.*

*A Mariana Oliveira, que além de amiga trouxe muito aprendizado contribuindo muito para realização desse trabalho.*

*A todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização desse projeto incluindo Adriana Rabbe, Gabriel Mendes e a professora Hélida.*

*Ao programa de pós-graduação do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB-UFMG).*

*Às agências de fomentos a pesquisa, FAPEMIG, Capes, CNPq, INCT-NanoBiofar.*

*A todos, meu muito obrigado!*

*“Se a ciência disse uma coisa e os meus escritos outra, jogue os meus escritos fora.”.*

*Allan Kardec*

Esse trabalho foi realizado no Laboratório de Hipertensão do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), com o suporte financeiro das agências de fomento: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em NanobioFarmacêutica (INCT) .

## RESUMO

O câncer de pele é uma das malignidades mais comuns, correspondendo a 30% de todas as neoplasias malignas registradas no país. O tipo melanoma, apesar de menos frequente é o mais agressivo, com alta possibilidade de metástase e complicações como a caquexia associada ao câncer. A caquexia associada ao câncer leva à severa perda de massa muscular e depleção do tecido adiposo em quase metade dos pacientes com câncer. Já está descrito o envolvimento do Sistema Renina Angiotensina (SRA) no desenvolvimento do câncer e na fisiopatologia da caquexia no tecido muscular. O heptapeptídeo angiotensina-(1-7) foi investigado por seu efeito antitumoral e anticaquético pela ativação de seu receptor (MAS) e em nosso grupo, recém descrevemos o efeito antiproliferativo *in vitro* de outro peptídeo do SRA, a Alamandina. Nosso objetivo foi avaliar a participação da Alamandina no processo de tumorigênese e desenvolvimento de caquexia em um modelo de melanoma utilizando camundongos C57BL6/J (CEUA: 198/2018). Métodos: Camundongos foram inoculados com células B16F10 e após formação de tumor palpável, foram randomizados nos grupos para tratamento oral por gavagem: HPβCD 82μg/Kg/dia ou alamandina 30, 50 e 100μg/Kg/dia. O peso corporal e variação do volume tumoral foram avaliados durante catorze dias de tratamento e após a eutanásia dos animais, os tecidos foram coletados para análise. Resultados: Foi observada redução significativa da massa tumoral (HPβCD 2±0,6g Ala30μg/Kg/dia 1,76±0,5g Ala50μg/Kg/dia 0,6±0,4g e Ala100μg/Kg/dia 2,5±0,2g) e volume (HPβCD 585,2±261,3mm<sup>3</sup>; Ala30μg 395,1±206,6mm<sup>3</sup>; Ala50μg 297,03±122,87mm<sup>3</sup>; Ala100μg 596,27±396,88mm<sup>3</sup>) após catorze dias de tratamento com alamandina. A massa corporal dos animais foi preservada pelo tratamento com alamandina, sendo observada intensa perda no grupo não tratado com o peptídeo (CT 10,03±3,222%; HPβCD -4,073±2,127%; Ala30μg 0,1880±2,980%; Ala50μg 4,744±6,063%; Ala100μg 5,946±6,934%). Além disso, a perda de massa muscular observada nos animais recebendo apenas ciclodextrina foi revertida em parte pela alamandina (mensurada pela porcentagem da massa muscular ou adiposa comparada com a massa corporal inicial): gastrocnêmio (CT 0,60±0,026%; HPβCD 0,46±0,018%; Ala30μg 0,049±0,038%; Ala50μg 0,5720± 0,04877%; Ala100μg 0,5537± 0,07114%); tibial anterior (CT 0,164± 0,00958%; HPβCD 0,148± 0,148%; Ala30μg 0,149±0,0208%; Ala50μg 0,203±0,0274%; Ala100μg 0,164±0,0168%); sóleo (CT 0,02220±0,04245%; HPβCD 0,01197±0,02337%; Ala30μg 0,01868±0,02716%; Ala50μg 0,02461±0,03107%; Ala100μg 0,01580±0,02402%) e gordura epididimal (CT 1,01±0,165%; HPβCD 0,208±0,181%; Ala30μg 0,795±0,349%; Ala50μg 0,792±0,225%; Ala100μg 0,590±0,0886%). Conclusões: Nossos dados sugerem que a formulação de ciclodextrina contendo alamandina apresenta efeito antitumoral e anticaquético em modelo de melanoma murino com células B16F10.

**Palavras-chave:** câncer; melanoma; caquexia; sistema renina angiotensina; alamandina



## **ABSTRACT**

Skin cancer is one of the most common malignancies, accounting for 30% of all cancers registered in the country. The melanoma, although less frequent, is the most aggressive, with a high possibility of metastasis and complications such as cancer-associated cachexia. Cancer-associated cachexia leads to severe muscle wasting and adipose tissue depletion in nearly half of cancer patients. The Renin Angiotensin System (RAS) implication in the development of cancer and in the pathophysiology of cachexia has already been described. The heptapeptide angiotensin-(1-7) was investigated for its antitumor and anti-cachectic effect by activating its receptor (Mas) and in our group; we have just described the in vitro antiproliferative effect of another RAS peptide, Alamandine. Our aim was to evaluate the participation of Alamandine in the process of tumorigenesis and development of cachexia in a melanoma model using C57BL6/J mice (CEUA: 198/2018). Methods: Mice were inoculated with B16F10 cells and after palpable tumor formation, they were randomized into groups for gavage oral treatment: HP $\beta$ CD 82 $\mu$ g/Kg/day or alamandine 30, 50 and 100 $\mu$ g/Kg/day. Body weight and tumor volume variation were evaluated during fourteen days of treatment and after animals euthanasia, tissues were collected for analysis. Statistical analyzes were performed using GraphPad Prism 8, with Student's t test for independent samples or ANOVA. Results: A significant reduction in tumor mass was observed (HP $\beta$ CD 2.015 $\pm$ 0.6376g Ala30 $\mu$ g/Kg/day 1.776 $\pm$ 0.5584g Ala50 $\mu$ g/Kg/day 0.6730 $\pm$ 0.4722g and Ala100 $\mu$ g/Kg/day 2.595 $\pm$ 0.2317g) and volume (HP $\beta$ CD 585.27 $\pm$ 261.37mm<sup>3</sup>; Ala30 $\mu$ g 395.16 $\pm$ 206.67mm<sup>3</sup>; Ala50 $\mu$ g 297.03 $\pm$ 122.87mm<sup>3</sup>; Ala100 $\mu$ g 596.27 $\pm$ 396.88mm<sup>3</sup>) after fourteen days of treatment with alamandine compared to tumor-bearing animals receiving only empty cyclodextrin. The body mass of the animals was preserved by treatment with alamandine, with intense weight loss in the non-treated group (CT 10.03 $\pm$ 3.222%; HP $\beta$ CD -4.073 $\pm$ 2.127%; Ala30 $\mu$ g 0.1880 $\pm$ 2.980%; Ala50 $\mu$ g 4.744 $\pm$  6.063%; Ala100 $\mu$ g 5.946 $\pm$ 6.934%). In addition, the loss of muscle mass observed in animals receiving only cyclodextrin was partially reversed by alamandine (measured by the percentage of muscle or fat mass compared to the initial body mass): gastrocnemius (CT 0.60 $\pm$ 0.026%; HP $\beta$ CD 0.46 $\pm$ 0.018%; Ala30 $\mu$ g 0.049 $\pm$ 0.038%; Ala50 $\mu$ g 0.5720 $\pm$  0.04877%; Ala100 $\mu$ g 0.5537 $\pm$  0.07114%); anterior tibial (CT 0.164 $\pm$  0.00958%; HP $\beta$ CD 0.148 $\pm$  0.148%; Ala30 $\mu$ g 0.149 $\pm$ 0.0208%; Ala50 $\mu$ g 0.203 $\pm$ 0.0274%; Ala100 $\mu$ g 0.164 $\pm$ 0.0168%); soleus (CT 0.02220 $\pm$ 0.04245%; HP $\beta$ CD 0.01197 $\pm$ 0.02337%; Ala30 $\mu$ g 0.01868 $\pm$ 0.02716%; Ala50 $\mu$ g 0.02461 $\pm$ 0.03107%; Ala100 $\mu$ g 0.01580 $\pm$ 0.02402 %) and epididymal fat (CT 1.01 $\pm$ 0.165%; HP $\beta$ CD 0.208 $\pm$ 0.181%; Ala30 $\mu$ g 0.795 $\pm$ 0.349%; Ala50 $\mu$ g 0.792 $\pm$ 0.225%; Ala100 $\mu$ g 0.590 $\pm$ 0.0886%). Conclusions: Our data suggest that the cyclodextrin formulation containing alamandine has an antitumor and anti-cachectic effect in a murine melanoma model with B16F10 cells.

**Keywords:** cancer; melanoma; cachexia; renin angiotensin system; alamandine.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Inflamação sistêmica induzida por tumor e impacto no metabolismo.....	27
FIGURA 2 – Esquema simplificado do sistema renina-angiotensina (SRA).....	29
FIGURA 3 – Ações antagônicas dos eixos angII e ang-(1-7) no desenvolvimento do câncer.....	31
FIGURA 4 – Representação esquemática da rede de fosforilação envolvida no efeito antiproliferativo da Alamandina em célula tumoral humana.....	34
FIGURA 5 – Imagem representativa de uma colônia formada por células B16F10 após 7 dias de cultivo.....	39
FIGURA 6 – Imagem representativa da formação inicial de tumor sólido após implantação de células B16F10 em camundongos C57BL/6J.....	40
FIGURA 7 – Representação esquemática de delineamento experimental.....	41
FIGURA 8 – Método de extração em fase sólida utilizando cartuchos com resina C18 e coletor à vácuo Visiprep™ SPE.....	43
FIGURA 9 – Grade utilizada para o teste de força Kondziela.....	46
FIGURA 10 – Viabilidade de células B16F10 expostas a Alamandina.....	49
FIGURA 11 – Regressão linear para cálculo da IC50 teórica da alamandina em células B16F10.....	50
FIGURA 12 – Ensaio de formação de colônias de células B16F10 expostas a Alamandina.....	51
FIGURA 13 – Progressão tumoral de implante singênico B16F10 em animais tratados por gavagem com alamandina incluída em HPβCD (30, 50 e 100μg/Kg/dia em) em comparação com o grupo ciclodextrina vazia (HPβCD).....	52
FIGURA 14 – Representação gráfica do efeito da alamandina em modelo de tumor singênico murino.....	53
FIGURA 15 – Níveis plasmáticos de peptídeos do SRA em animais portadores de tumor tratados com alamandina incluída em ciclodextrina comparados com animais tratados com ciclodextrina vazia.....	54

FIGURA 16 – Quantificação de peptídeos do SRA em tecido tumoral de animais tratados com alamandina incluída em ciclodextrina (50µg/Kg/dia) comparados com animais tratados com ciclodextrina vazia.....	55
FIGURA 17 – Regressão linear modelando a relação entre a concentração tumoral de angII e o volume tumoral final em animais tratados com alamandina incluída em ciclodextrina (50µg/Kg/dia) comparados com animais tratados com ciclodextrina vazia.....	56
FIGURA 18 – Inibição da perda de massa corporal induzida pela alamandina em animais portadores de tumor.....	57
FIGURA 19 – Desempenho (em segundos) de animais portadores de tumor tratados com alamandina incluída em ciclodextrina (20, 50 e 100µg/Kg/dia) comparados com animais tratados com ciclodextrina vazia.....	58
FIGURA 20 – Parâmetros metabólicos de animais alimentados.....	59
FIGURA 21 – Reserva hepática de glicogênio em animais alimentados.....	60
FIGURA 22 – Inibição da perda muscular induzida pela alamandina em animais portadores de tumor.....	61
FIGURA 23 – Inibição da perda de tecido adiposo induzida pela alamandina em animais portadores de tumor.....	62
FIGURA 24 – Efeito da alamandina em órgãos de animais portadores de tumor.....	63
FIGURA 25 – Viabilidade de células C2C12 expostas a CM, angII e Alamandina por 72h.....	64

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Gradiente cromatográfico das fases móveis A1 (0,1% ácido fórmico em H<sub>2</sub>O Milli-Q) e B1 (ácido fórmico a 0,1% em ACN) em função do tempo em minutos ..... 44

TABELA 2 – Transições monitoradas pela espectrometria de massas no modo de monitoramento de reação seletiva (SEM) para os peptídeos ang-(1-7), angII, angl e alamandina.....45

## LISTA DE SIGLAS

A.U.	Unidades arbitrárias (do inglês – <i>arbitrary units</i> )
A549	Linhagem celular de adenocarcinoma de pulmão humano
A-779	D-Alanina-Ang-(1-7) – Antagonista seletivo do receptor Mas
ACN	Acetonitrila
AGT	Angiotensinogênio
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
AKT1	Proteína quinase B
Ala	Alamandina
AMP	Aminopectidase
Ang A	Angiotensina A
Ang I	Angiotensina I
Ang II	Angiotensina II
Ang-(1-12)	Angiotensina-(1-12)
Ang-(1-7)	Angiotensina-(1-7)
Ang-(1-9)	Angiotensina-(1-9)
APS	Persulfato de amônio
AT1	Receptor angiotensinérgico subtipo 1
AT2	Receptor angiotensinérgico subtipo 2
Atrogin-1	<i>Muscle atrophy F-box</i>
AVE	Acidente Vascular Encefálico
B16F10	Linhagem celular de melanoma murino
BCRJ	Banco de Células do Rio de Janeiro
BRAF	Proto-oncogene B-Raf
BSA	Albumina de soro bovino
C18	Octadecil
C2C12	Linhagem celular de mioblasto murino

CaCl <sub>2</sub>	Cloreto de cálcio
CAF's	Cancer associated fibroblasts
CAM	Chick Chorioallantoic Membrane
CHO	Chinese Hamster Ovary
CM	Meio condicionado (do inglês - <i>conditioned media</i> )
CNE1-2	Carcinoma escamoso nasofaríngeo humano 1 e 2
CT26	Linhagem de adenocarcinoma cólon
CTLA-4	Proteína T-Linfócito-Associada citotóxico 4
CVLM	Medula caudal ventrolateral
D.O.	Densidades óticas
DC	Descarboxilase
DM	Meio de diferenciação (do inglês - <i>differentiation media</i> )
DMEM-F12	Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient
DPBS	Dulbeco's Tampão fosfato-salino
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
D-Pro	D-Pro7-Ang-(1-7) – Antagonista não seletivo MrgD
DTT	Ditiotreitol
DU-145c	Linhagem celular de carcinoma áncréatico
DUSP1	Fosfatase dual específica
E.P.M.	Erro padrão da média
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina
ECA2	Enzima Conversora de Angiotensina 2
EDL	Extensor longo dos dedos
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EL4 T	Linhagem celular de linfoma murino
ERK1/2	Proteína quinase regulada por sinal extracelular 1 e 2
ESI	Electrospray
ETOH	Etanol absoluto
FDA	Food and Drug Administration

FoxO1	Fator de transcrição Forkhead box, subgrupo O1
H2SO4	Ácido sulfúrico
HBSS	Hank's Balanced Salt solution - Solução salina balanceada de Hanks
HCl	Ácido Clorídrico
HeLa	Linhagem celular de câncer de colo de útero
HMF	Hidroximetilfurfural
IARC	International Agency for Research on Cancer
ICC	Insuficiência cardíaca crônica
ICV	Infusão intracerebroventricular
iECA	Inibidores de ECA
IFN- $\gamma$	Interferon gama
IL-1	Interleucina-1
IL-2	Interleucina-2
IL-6	Interleucina-6
IMC	Índice de massa corporal
INCA	Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
JNK	c-Jun N-terminal quinase
KOH	Hidróxido de potássio
LC-MS/MS	Espectrometria de massas em tandem acoplado a cromatografia líquida
LLC	Linhagem celular de linfoma de rato
LNCap	Linhagem celular de carcinoma prostático
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
Mas	Receptor da Ang-(1-7)
MIA PaCa-2	Linhagem celular de carcinoma pancreático
MMP-2	Metaloproteinase 2
MMP-9	Metaloproteinase 9
MrgD	Receptor acoplado a proteína G relacionado ao Mas - tipo D
MS	Espectrometria de Massas (do inglês - <i>Mass spectrometry</i> )

MS2	Espectrometria de massas em tandem ( <i>MS/MS</i> )
mTOR	Proteína alvo da rapamicina em mamíferos
MTT	<i>Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide</i> (sais de tetrazólio)
MuRF1	<i>Muscle RING finger protein</i>
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sulfato de sódio saturado
NEP	Endopeptidase neutra
NPY	Neuropeptídeo Y
p38	Proteína quinase ativada por mitógenos p38
PAF	Polineuropatia amiloidótica familiar
PC3	Linhagem celular humana de tumor de próstata
PCP	Prolil-carboxipeptidase
PD-1	Proteína de morte celular programada 1
PE	Eficiência de plaqueamento (do inglês – <i>plating efficiency</i> )
PEP	Prolil-endopeptidase
pH	Potencial hidrogeniônico
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinase
PIGF	Fator de crescimento placentário
PMSF	Para- metilsulfonil fluoreto
POOH	p-hidroxi-benzoato de mercúrio
PTEN	Fosfatase homóloga à tensina deletada no cromossomo 10
RPM	Rotações por minuto
RVLM	Medula rostral ventrolateral
s.c.	Subcutâneo
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SE	Fração de sobrevivência (do inglês – <i>surviving fraction</i> )
SFBi	Soro fetal bovino inativado
sFLT1	fração solúvel do receptor de VEGFR-1
SPE	Extração em fase sólida (em inglês <i>solid phase extraction</i> )



SRA	Sistema Renina Angiotensina
SRM	Selective Reaction Monitoring
SUP	Sistema ubiquitina-proteassoma
TBS-T	Solução Tris-Base 1M pH 7,6 contendo 0,1% de Tween 20.
TFA	Ácido trifluoroacético
TGF- $\beta$	Fator de crescimento e transformação beta
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral
TOP	Timet oligopeptidase
T-VEC	Herpes vírus modificado com atividade oncolítica
TWI	Inibição tumoral ( <i>tumor weight inhibition</i> )
UPLC	Cromatografia líquida de ultra desempenho
UV	Ultravioleta
VEGF-A	Fator de crescimento vascular endotelial
$\alpha$ -MSH	Melanocortina hipotalâmica

## LISTA DE SÍMBOLOS

mg	Miligrama
min	Minuto
g	Grama
Kg	Quilograma
µg	Micrograma
µL	Microlito
µM	Micrômetro
m/z	Relação massa/carga
H <sub>2</sub> O	Água
%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
cm <sup>3</sup>	centímetros cúbicos
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
M	Molar (mol/L)
nm	Nanômetro
mm <sup>3</sup>	Milímetros cúbicos
nM	Nanomolar (nmol/L)
mL	Mililitro
hz	Hertz
Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	Pirofosfato de sódio
NaF	Fluoreto de sódio
NaCl	Cloreto de sódio
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	Ortovanadato sódico
mM	Milimolar (mmol/L)
V	Volts
p/v	Peso/Volume
v/v	Volume/Volume
Å	Angstrom
kV	Quilovolt
ms	Milissegundos
ng	Nanograma
pg	Picograma

≈

Aproximadamente

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>22</b>
1.1	<i>Melanoma</i> .....	22
1.2	<i>Caquexia neoplásica</i> .....	24
1.3	<i>Sistema Renina Angiotensina (SRA) e câncer</i> .....	28
1.4	<i>Alamandina</i> .....	33
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA E OBJETIVO</b> .....	<b>35</b>
2.1	<i>Justificativa e Objetivo Geral</i> .....	35
2.2	<i>Objetivos Específicos</i> .....	36
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>37</b>
3.1	<i>Cultura de células</i> .....	37
3.2	<i>Teste de viabilidade celular</i> .....	37
3.3	<i>Ensaio clonogênico</i> .....	37
3.4	<i>Animais</i> .....	39
3.4.1	<i>Modelo de melanoma murino heterotópico singênico</i> .....	39
3.4.2	<i>Mensuração da atividade de metaloproteinases (MMPs) no tecido tumoral</i> .....	42
3.4.3	<i>Quantificação plasmática e tecidual de alamandina e peptídeos do Sistema Renina Angiotensina</i> .....	42
3.5	<i>Avaliação do potencial efeito anticaquético da alamandina</i> .....	45
3.5.1	<i>Teste de força</i> .....	46
3.5.2	<i>Mensuração de parâmetros séricos</i> .....	47
3.5.3	<i>Avaliação do efeito da alamandina na viabilidade de células C2C12</i> 48	
<b>4</b>	<b>ANÁLISE ESTATÍSTICA</b> .....	<b>48</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>49</b>
5.1	<i>Efeito da Alamandina na viabilidade celular da linhagem B16F10</i> ....	49
5.2	<i>Efeito da Alamandina na formação de colônias de células B16F10 in vitro</i> .....	50
5.3	<i>Efeito da administração oral de Alamandina no crescimento tumoral</i>	51
5.4	<i>Níveis plasmáticos e tecidual tumoral de Alamandina e peptídeos do SRA</i> .....	53
5.5	<i>Efeito da administração oral de Alamandina na caquexia relacionada ao câncer</i> .....	56

<b>5.6</b>	<b><i>Efeito da alamandina na viabilidade de miotubos murinos</i></b> .....	<b>63</b>
<b>6</b>	<b><i>DISCUSSÃO</i></b> .....	<b>65</b>
<b>7</b>	<b><i>CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS</i></b> .....	<b>73</b>
<b>8</b>	<b><i>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</i></b> .....	<b>74</b>

## **1 INTRODUÇÃO**

### **1.1 Melanoma**

O termo câncer abrange mais de 100 diferentes tipos de doenças que têm em comum a proliferação celular desordenada (Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva - INCA, 2019), podendo invadir tecidos adjacentes ou órgãos distantes. Mesmo com o avanço da medicina e tecnologia nos últimos anos, em muitos casos, a doença continua sendo um desafio para o diagnóstico adequado e, muitas vezes, irresponsiva aos tratamentos disponíveis. Com o crescimento populacional e aumento da expectativa de vida, o câncer se mantém como a segunda principal causa de morte no mundo, logo após as doenças cardiovasculares (Naghavi et al. 2017). Dados estatísticos do projeto Globocan 2020, dirigido pela Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC, do inglês International Agency for Research on Cancer), estimaram 19,3 milhões de novos casos de câncer em todo o mundo, e quase 10 milhões de mortes por câncer, no ano de 2020. A expectativa do projeto para 2040 é de 28,4 milhões de casos, um aumento de 47% em relação a 2020 (Sung et al. 2021). No Brasil, a estimativa do INCA para cada ano do triênio 2020-2022 é de 625 mil casos novos de câncer, sendo a neoplasia de pele a mais abrangente dentre todos os tipos. Os cânceres de pele são usualmente categorizados em não melanoma e melanoma (Rebecca, Somasundaram, e Herlyn 2020a). Os primeiros são os mais comuns e com melhor prognóstico quando diagnosticados precocemente. Os tipos não melanoma de maior ocorrência são o carcinoma basocelular, de origem nas células basais da epiderme, e o epidermoide, de origem na camada mais superficial da pele. Já o tipo melanoma é o menos comum em incidência, embora tenha pior prognóstico pela rápida progressão e alta possibilidade de metástase, principalmente para outras regiões da pele, linfonodo, pulmão, fígado, cérebro, ossos e intestinos (Chin et al, 1998). Ainda segundo o projeto Globocan 2020, o câncer de pele não melanoma será o mais incidente mundialmente (177 mil), seguido pelos cânceres de mama e próstata (66 mil cada), cólon e reto (41 mil), pulmão (30 mil) e estômago (21 mil) (Sung et al. 2021). Os tipos de câncer mais frequentes em homens, à exceção do câncer de pele não melanoma, serão próstata (29,2%), cólon e reto (9,1%), pulmão (7,9%), estômago (5,9%) e cavidade oral (5,0%). Nas mulheres, exceto o câncer de pele não melanoma, os

cânceres de mama (29,7%), cólon e reto (9,2%), colo do útero (7,5%), pulmão (5,6%) e tireoide (5,4%) figurarão entre os principais. O câncer de pele não melanoma representará 27,1% de todos os casos de câncer em homens e 29,5% em mulheres (Sung et al. 2021).

Embora represente menos de 5% de todos os tipos de câncer de pele, o melanoma está associado a mais de 70% das mortes associadas a neoplasias de pele mundialmente (Rebecca, Somasundaram, e Herlyn 2020). No Brasil, 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 93.170 em mulheres, correspondendo a um risco estimado de 80,12 casos novos a cada 100 mil homens e 86,66 casos novos a cada 100 mil mulheres. Quanto ao câncer de pele melanoma, o número de casos novos estimados será de 8.450 novos casos, sendo 4.200 em homens e de 4.250 em mulheres com cerca de 1.978 casos fatais (cerca de 23%). Esses valores correspondem a um risco estimado de 4,03 casos novos a cada 100 mil homens e 3,94 para cada 100 mil mulheres (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2019).

Como evidenciado por esses dados estatísticos, as malignidades de pele são as mais frequente em ambos os sexos. São mais recorrentes em pessoas de pele clara acima dos 40 anos, e a probabilidade aumenta quanto maior a exposição à radiação ultravioleta (UV) solar, especialmente na infância (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2019). O melanoma tem origem em mutações dos melanócitos nas mucosas (mucosal), olhos (ocular), mas principalmente na pele (cutâneo), pela exposição à radiação UV (Jenkins e Fisher 2021). Para descrição da doença utiliza-se o sistema TNM da *American Joint Committee on Cancer* (Gershenwald et al. 2017), que utiliza parâmetros como tamanho do tumor (T); espessura, diretamente relacionada à possibilidade de metástase (medida de Breslow); ulceração, usualmente com pior prognóstico; disseminação para linfonodos regionais próximos (N) e presença de metástase para outras regiões do corpo (M). Assim, resumidamente, podemos categorizar como melanoma *in situ* (estágios I e II), presença de nódulo (estágio III), e doença metastática (estágio IV). Quando o melanoma se limita ao local inicial do diagnóstico, é possível a extirpação cirúrgica do tecido tumoral com adequada definição da margem cirúrgica, garantindo que as áreas adjacentes às bordas da cirurgia não

estejam invadidas por células tumorais (Joyce e Skitzki 2020). Um dos grandes desafios no enfrentamento dessa doença é a alta capacidade de metástase, principalmente para o cérebro, com incidência estimada em 60% dos casos (Rebecca, Somasundaram, e Herlyn 2020). Uma vez disseminado, uma pequena parcela dos indivíduos apresenta boa resposta aos tratamentos atualmente disponíveis. A estimativa de sobrevivência para indivíduos diagnosticados com melanoma metastático era menos que 5% há 10 anos, mas atualmente, graças aos avanços em pesquisas de novos fármacos e fomento ao desenvolvimento da imunoterapia, um a cada dois pacientes estão vivos após cinco anos do diagnóstico inicial da doença (Jenkins e Fisher 2021). Até o ano de 2010 os únicos tratamentos aprovados pelo FDA (*Food and Drug Administration*) eram administração de altas doses de interleucina 2 (IL-2) e o quimioterápico dacarbazina, um agente alquilante com alta incidência de efeitos adversos, incluindo mielosupressão (Jenkins e Fisher 2021). A partir desse ano, diversas novas drogas foram estudadas e aprovadas pelo FDA, incluindo agentes imunoterápicos inibidores do proto-oncogene BRAF (produz a proteína serina/treonina cinase B-raf), com presença de mutações em quase metade dos casos de melanoma; anticorpos anti-CTLA-4 (Proteína T-Linfócito-Associada citotóxico 4), anti-PD-1 (proteína de morte celular programada 1) e um herpes vírus modificado com atividade oncolítica (T-VEC) (Jenkins e Fisher 2021).

Quando em estágio avançado e com presença de metástases, o melanoma pode apresentar alta resistência e adaptação aos tratamentos farmacológicos disponíveis atualmente (Joyce e Skitzki 2020; Gershenwald et al. 2017). Assim como outros tipos de câncer, nesse estágio, a doença pode ocasionar complicações severas como a caquexia associada ao câncer. De fato, em experimentação, foram observadas a degeneração muscular e perda de força associado a esse tipo de câncer. (Voltarelli et al. 2017).

## **1.2 Caquexia neoplásica**

Além da alteração funcional do tecido/órgão onde se localiza um câncer, as células tumorais geram um padrão inflamatório que resulta em diversos sintomas chamados paraneoplásicos, incluindo a caquexia neoplásica, ou caquexia relacionada ao câncer. A caquexia é observada em muitas condições médicas,



incluindo câncer, síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), esclerose múltipla, insuficiência cardíaca crônica (ICC), tuberculose, polineuropatia amiloidótica familiar (PAF), envenenamento por mercúrio (acrodinia) e deficiência hormonal (Tisdale 2009; K. C. H. Fearon, Glass, e Guttridge 2012). A condição é uma complicação comum em diversos tipos de neoplasias, caracterizada por inflamação sistêmica, perda de massa muscular, perda de tecido adiposo e, secundariamente, anorexia (Baracos 2006; Aoyagi et al. 2015). Ocorre em cerca de metade dos pacientes oncológicos reduzindo a qualidade de vida e diminuindo a resposta do indivíduo à quimioterapia e radioterapia, o que pode levar a um índice de 22% de óbito nessa população (Aoyagi et al. 2015). Define-se caquexia como uma síndrome multicausal caracterizada por perda de massa magra, com ou sem perda de tecido adiposo, e que não pode ser revertida pelo suporte nutricional, com progressiva incapacidade funcional (K. Fearon et al. 2011). Até o momento não existe uma terapia direcionada e eficaz para a caquexia e os tratamentos empregados são medidas paliativas para atenuação dos sintomas e redução da angústia tanto do paciente quanto dos familiares (Hopkinson et al. 2006).

Progressivamente podemos classificar essa condição em três etapas:

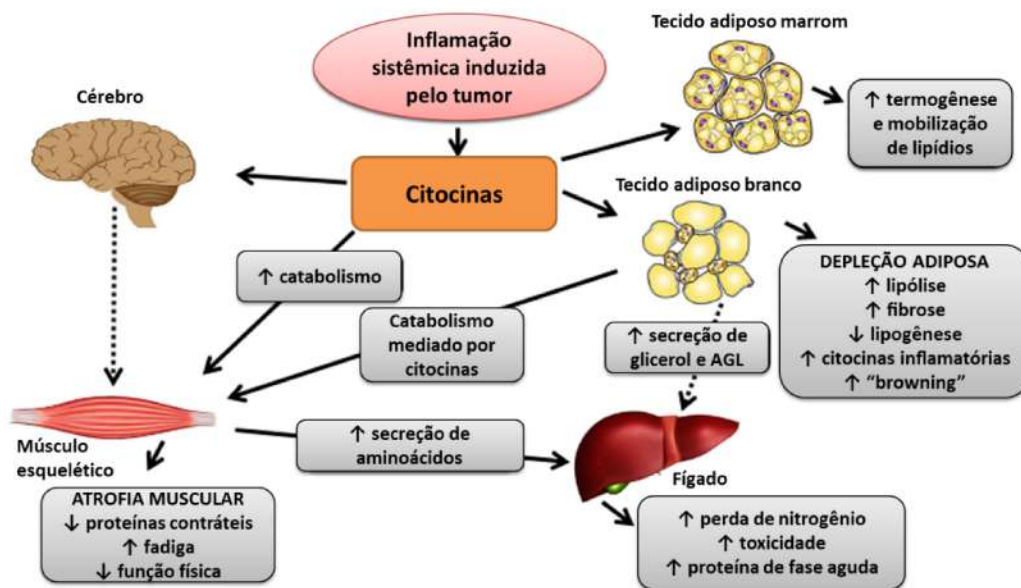
1. Pré-caquexia: perda de massa corporal de até 5% no período de 6 meses associada a alterações como anorexia e resistência a insulina.
2. Caquexia: perda de massa corporal acima de 5% no período de 6 meses ou acima de 2% com índice de massa corporal (IMC) inferior a 20 ou associada à sarcopenia.
3. Caquexia refratária: associada ao câncer em estágio muito avançado caracteriza-se por intensa atividade catabólica sistêmica e expectativa de vida inferior a três meses (K. Fearon et al. 2011).

A perda de peso é um fator importante para prognóstico do paciente diagnosticado com caquexia associada ao câncer. Quanto maior a perda de peso, pior a resposta ao tratamento quimioterápico e menor a chance de sobrevivência (Tisdale 2009). A perda de peso no paciente caquético está relacionada à depleção do tecido adiposo e muscular esquelético, tendo consequências graves, principalmente pela perda muscular. A depleção do tecido muscular esquelético e cardíaco podem se exacerbar gerando um quadro de fadiga, limitação funcional e

morte (Tisdale 2009). Diversos são os mecanismos envolvidos na patogênese da caquexia associada ao câncer (Figura 1). Esses fatores são relacionados às alterações metabólicas geradas pelo tecido tumoral, bem como às citocinas pró-inflamatórias geradas pelas células tumorais, incluindo anorexia, redução da atividade física, diminuição da secreção de hormônios anabólicos e alteração do metabolismo de proteínas, lipídios e carboidratos (Tisdale 2009; Baracos 2006; K. C. H. Fearon, Glass, e Guttridge 2012). Pouco se sabe da fisiopatologia da caquexia neoplásica, sabe-se que há uma intensa produção de citocinas pró-inflamatórias e desenvolvimento de uma inflamação sistêmica. Há evidências sugerindo a participação de citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), interleucina-1 e 6 (IL-1 e IL-6), e interferon gama (IFN- $\gamma$ ) (Tan et al. 2008; Loumaye e Thissen 2017). Resumidamente, tais citocinas agem em órgãos alvos gerando alterações como:

- Hipermetabolismo: aumento do gasto energético em repouso por ativação de ciclos fúteis e desperdício energético; disfunção mitocondrial e aumento da atividade glicolítica e hiperlactatemia; ativação do ciclo de Cori para produção de glicose a partir do aumento da abundância do lactato;
- Alteração do apetite e anorexia: as citocinas atravessam a barreira hematoencefálica chegando aos centros reguladores do apetite no hipotálamo, gerando um desequilíbrio entre fatores orexígenos como o neuropeptídeo Y (NPY) e anorexígenos como a melanocortina hipotalâmica  $\alpha$ -MSH.
- Aumento da proteólise: inibição das vias de anabolismo e ativação do sistema ubiquitina-proteassoma (SUP) no músculo esquelético e, conseqüentemente, dos atrogenes Atrogin-1 (*Muscle atrophy F-box*) e MuRF1 (*muscle RING finger protein*), gerando degradação proteica e mobilização de aminoácidos para o fígado.
- Aumento da lipólise: desarranjo da via lipolítica no tecido adiposo, com aumento da taxa de lipólise e fornecimento de ácidos graxos livres e glicerol para substrato da glicogênese hepática (Baracos 2006; Tisdale 2009; Yoshida e Delafontaine 2015; Bruggeman et al. 2016; Loumaye e Thissen 2017).

Figura 1: Inflamação sistêmica induzida por tumor e impacto no metabolismo. Dentre as inúmeras citocinas liberadas pelo tumor, destacam-se TNF $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ . Tais citocinas são capazes de atuar em diferentes órgãos e sistemas, promovendo inflamação, alterações metabólicas e imunológicas que afetam direta e indiretamente órgãos essenciais na fisiopatologia da caquexia, como o músculo esquelético estriado e o tecido adiposo branco e marrom. Setas contínuas referem-se a mecanismos já descritos, e setas pontilhadas referem-se a mecanismos ainda não conhecidos.



Fonte: Adaptado de (Leal et al. 2021). Abreviaturas: AGL, ácidos graxos livres.

As particularidades desse tipo de neoplasia fazem com que seja alvo de extensas pesquisas por todo mundo. Existem variados modelos de investigação incluindo implante singênico, engenharia genética, transplantes xenográficos e transplantes derivados de pacientes (Rebecca, Somasundaram, e Herlyn 2020). Neste estudo utilizamos o modelo singênico com células da linhagem B16F10 e camundongos C57BL/6J, um método acessível e que simula a dificuldade de tratamento do melanoma (Overwijk e Restifo 2001). A linhagem B16F10 é derivada de melanoma de camundongo C57BL/6J. É um sub-clone da linhagem B16, gerada injeção de células B16 em camundongos da mesma espécie e subcultura das células coletadas de formações tumorais secundárias nesses camundongos. O número F10 indica que esse processo foi repetido 10 vezes. Os sub- clones B16F1 e F10 são os mais utilizados para modelos de melanoma em camundongos, formando espontaneamente tumores sólidos após inoculação de células em animal da mesma espécie (Overwijk e Restifo 2001). O sub-clone F10

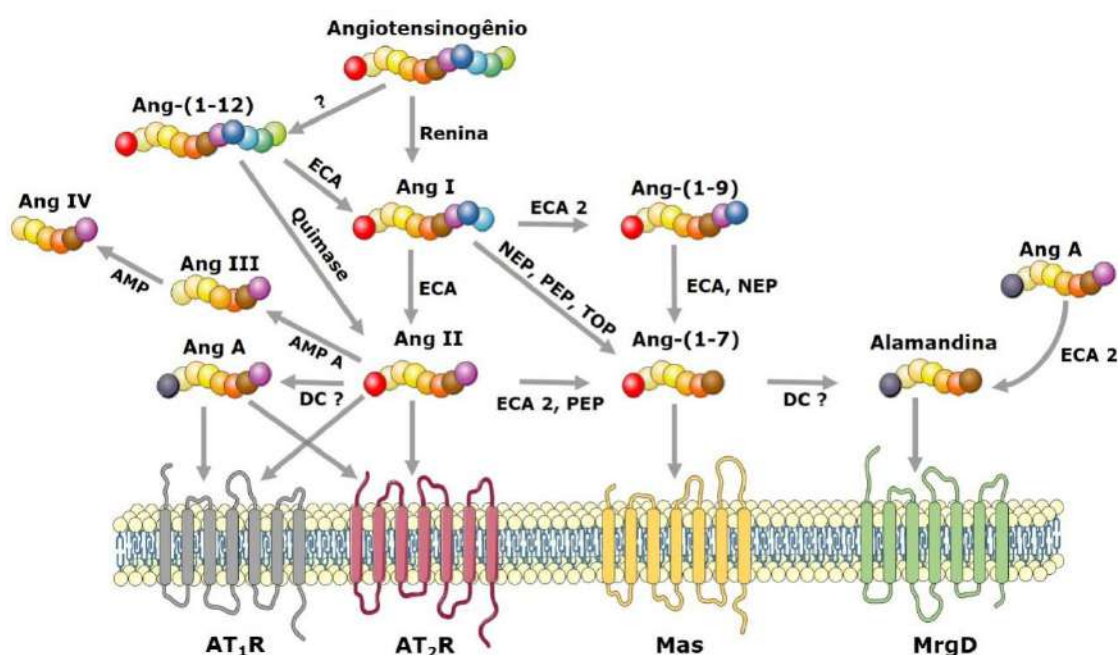
foi selecionado para este estudo por que, além da formação de tumor sólido palpável, também é capaz de induzir estado caquético nos animais inoculados, constituindo uma importante ferramenta tanto para estudo do melanoma, quanto da caquexia associada ao câncer.

### **1.3 Sistema Renina Angiotensina (SRA) e câncer**

O sistema renina angiotensina (SRA) (Figura 2) foi originalmente associado à fisiologia renal, tendo como principais funções a regulação da pressão arterial e manutenção do equilíbrio eletrolítico renal. Entretanto, diversas pesquisas têm evidenciado a complexidade desse sistema e participação em uma grande variedade de atividades regulatórias, incluindo angiogênese, proliferação celular, apoptose e inflamação (Deshayes e Nahmias 2005). A enzima renina, produzida pelas células justaglomerulares, catalisa a conversão da alfa-2 globulina hepática, angiotensinogênio (AGT) em angiotensina I (angI), um decapeptídeo, até então biologicamente inativo (Peach 1977). A angI é rapidamente convertida a angiotensina II (angII) pela atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA) (Skeggs, Kahn, e Shumway 1956). A angII, é um octapeptídeo caracterizado como principal efector do SRA, faz parte do clássico eixo ECA/angII/Receptor AT1 tendo como principais efeitos a vasoconstrição, proliferação celular e hipertrofia. Suas principais atividades biológicas são desencadeadas pelo receptor AT1, embora também atue como agonista do receptor AT2, mais significativamente expresso na fase fetal, mas ainda bem distribuído sistematicamente por toda a vida (Touyz e Berry 2002) com aparente atividade antagônica a aquelas desencadeadas pelo receptor AT1 (Touyz e Berry 2002; Smith e Missailidis 2004). O segundo, já também clássico eixo do SRA é representado pela enzima conversora de angiotensina do tipo II (ECA2), o heptapeptídeo angiotensina-(1-7) [ang-(1-7)] e seu receptor Mas. O eixo ECA2/ang-(1-7) /Receptor Mas apresenta efeitos biológicos tais como: vasodilatação, atividade antiproliferativa e anti-hipertrofica, contrabalanceando os efeitos do primeiro eixo (Santos et al. 2003). A ang-(1-7) é formada a partir da angI por ação de endopeptidases como a prolil endopeptidase (PEP), timet oligopeptidase (TOP) e endopeptidase neutra (NEP); a partir da angII pela ação da PEP ou ECA2 ou a partir da angiotensina-1-9 [ang-(1-9)], por ação da NEP ou ECA (Donoghue et al. 2000). A ang-(1-7), ligando-se

ao Mas (Santos et al. 2003) promove efeitos antagônicos aos da angII como vasodilatação e redução da pressão arterial, apoptose e inibição da proliferação celular (Ferrario et al. 1997; Cambados et al. 2017).

Figura 2. Esquema simplificado do sistema renina-angiotensina (SRA). Abreviações: ECA, enzima conversora de angiotensina; ECA2, enzima conversora de angiotensina 2; AMP, aminopeptidase; Ang-(1-12), angiotensina (1-12); angI, angiotensina I; angII, angiotensina II; angIII, angiotensina III; angIV, angiotensina IV; Ang-(1-7), angiotensina (1-7); Ang-(1-9), angiotensina (1-9), Ang A, angiotensina A; DC, descarboxilase; NEP, endopeptidase neutra (neprilisina); PEP, prolilendopeptidase; TOP, timet oligopeptidase.



Fonte: Adaptado de Passos-Silva, 2003.

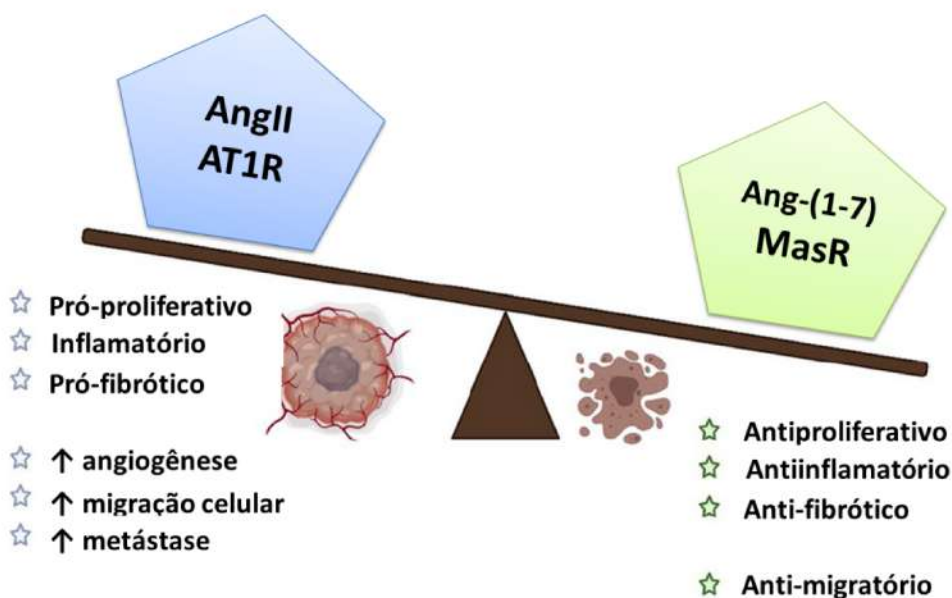
A angiotensina A (ang A) é um dos peptídeos mais recentemente descritos, originado pela descarboxilação do resíduo de aspartato, localizado na região N-terminal da angII, resultando em um resíduo de alanina (Jankowski et al. 2007). Assim como a angII, este peptídeo apresenta afinidade pelos receptores AT1 e AT2, e também induz atividade vasoconstritora e efeito pressórico, através da ativação do receptor AT1 (Yang et al. 2011; Coutinho et al. 2014). O mais novo componente do SRA, a Alamandina, foi descrita por recentemente Lautner e colaboradores (2013) como um heptapeptídeo biologicamente ativo e que é o alvo

de pesquisa deste trabalho e será melhor descrito mais adiante (Lautner et al. 2013).

Por toda essa complexidade e variedade de receptores e peptídeos locais e sistêmicos, o sistema renina angiotensina vem sendo descrito na fisiologia e fisiopatologia de múltiplos órgãos e sistemas. Nesse contexto, o SRA tem sua participação evidenciada no desenvolvimento e regulação de neoplasias por diversos estudos (Deshayes e Nahmias 2005; Ager, Neo, e Christophi 2008; George, Thomas, e Hannan 2010a; Afsar et al. 2021). Muitos componentes do sistema estão presentes em vários tecidos e órgãos, e são encontrados diferencialmente expressos no tecido tumoral cerebral, pulmonar, pancreático, mamário, prostático, intestinal, tegumentar e uterino (Deshayes e Nahmias 2005). Muitos estudos sugerem um desequilíbrio do SRA local no tecido tumoral, com aumento da abundância da angII e ativação do receptor AT1, culminando na exacerbação de seus efeitos pró-proliferativos, pró-angiogênicos e pró-sobrevivência celular (Daemen et al. 1991; Smith e Missailidis 2004; Deshayes e Nahmias 2005) (Figura 3). Em contrapartida, o eixo ECA2/ang-(1-7) /Mas tem sido postulado como efector de atividade antiproliferativa e antitumoral em diversos estudos *in vitro*, *in vivo* e estudos clínicos.



Figura 3. Ações antagônicas dos eixos angII e ang-(1-7) no desenvolvimento do câncer. Através do seu receptor AT1 a angII induz inflamação, fibrose, angiogênese, migração celular e metástase. Contraditoriamente, a Ang-(1-7), através de seu receptor, Mas, tem efeitos antiinflamatório, anti-fibrótico, antiproliferativo e anti-migração celular. Abreviações: angII angiotensina 2, AT1R receptor de angiotensina do tipo 1, Ang-(1-7) angiotensina-(1-7), MasR receptor Mas.



Fonte: Adaptado de (Afsar et al. 2021)

As ações antiproliferativas da angiotensina-(1-7) vêm sendo descritas, avaliando as possibilidades deste peptídeo como agente terapêutico para controle de neoplasias. Foram constatadas suas propriedades antiangiogênicas pela diminuição da densidade vascular de implante tumoral xenográfico, redução da formação de capilares em cultura celular de cordão umbilical humano e redução da neovascularização em membrana corioalantóica de embrião de galinha (CAM), o que os autores relacionam à modulação negativa da atividade do fator de crescimento endotelial vascular do tipo A (VEGF-A) (Soto-Pantoja, Menon, et al. 2009) e fator de crescimento placentário (PIGF); sendo os efeitos bloqueados pelo estímulo com A-779 (Antagonista receptor Mas) (Soto-Pantoja, Petty, et al. 2009). O estroma tumoral característico de tumores sólidos de mama também sofre modulação pelo estímulo da ang-(1-7) pela inibição da atividade do fator de crescimento e transformação beta (TGF- $\beta$ ) e MAP cinases ERK1/2; e ativação da fosfatase dual específica (DUSP1), com consequente inibição da ativação de miofibroblastos associados ao câncer (CAF's) e deposição de colágeno e

fibronectina, reduzindo a fibrose tecidual e perivascular (Cook et al. 2010). O peptídeo também foi capaz de modular negativamente o perfil metastático de células tumorais *in vitro* em cultura de linhagem celular tumoral pulmonar (A549), pela redução da expressão de metaloproteinases do tipo 2 e 9 (MMP-2 e MMP-9) e inibição da via proliferativa PI3K/AKT, MAP cinase p38 e c-Jun N-terminal cinase (JNK) (Wan 2011). Adicionalmente, preveniu metástase após injeção intra-aórtica de linhagem tumoral prostática (PC3) em camundongos, bem como inibiu o desenvolvimento de tumor heterotópico da mesma linhagem celular em tibia de camundongos com redução da osteoclastogênese e redução significativa dos níveis circulantes de VEGF (Krishnan, Smith, et al. 2013). Em outro modelo de implante xenográfico de linhagem tumoral prostática (LNCaP) em camundongos, foi observado redução do crescimento tumoral e da densidade vascular tumoral (Krishnan, Torti, et al. 2013). A ang-(1-7) promoveu aumento da fração solúvel do receptor do VEGF (sFlt-1 ou sVEGFR-1), levando à diminuição dos receptores tipo 1 e 2 do fator de crescimento e retenção do VEGF e PlGF na membrana celular. Em um estudo clínico fase I e II, o peptídeo administrado antes e depois de tratamento quimioterápico, indicou tolerância sem toxicidade com a dose limitante de 100 mg/kg, amenizando a citopenia quimioterápica em mulheres com diagnóstico recente de câncer de mama (Rodgers, Oliver, e diZerega 2006). Outro estudo clínico fase I utilizou injeções subcutâneas de ang-(1-7) diárias em dezoito pacientes com tumor sólido refratário a tratamentos convencionais. A dose limitante para toxicidade postulada foi 400 µg/kg, considerando um evento de acidente vascular encefálico (AVE) em um paciente e neuropatia craniana reversível em outro na dose de 700 µg/kg. Foi constatado melhora clínica que durou por três meses em três dos indivíduos acompanhados. O fator de crescimento placentário (PlGF) mostrou-se reduzido nos pacientes mais responsivos durante todo o ciclo de tratamento (Petty et al. 2009). Recentemente, foi demonstrado que a ativação do receptor Mas pelo agonista sintético AVE0991, atenua a atrofia de miotubos induzida por inanição *in vitro* e em modelo de tumor murino (CT26 – adenocarcinoma cólon), reduz o crescimento tumoral, atenua perda de massa e melhora atividade motora pela preservação de fibras musculares glicolíticas (Murphy et al. 2019).



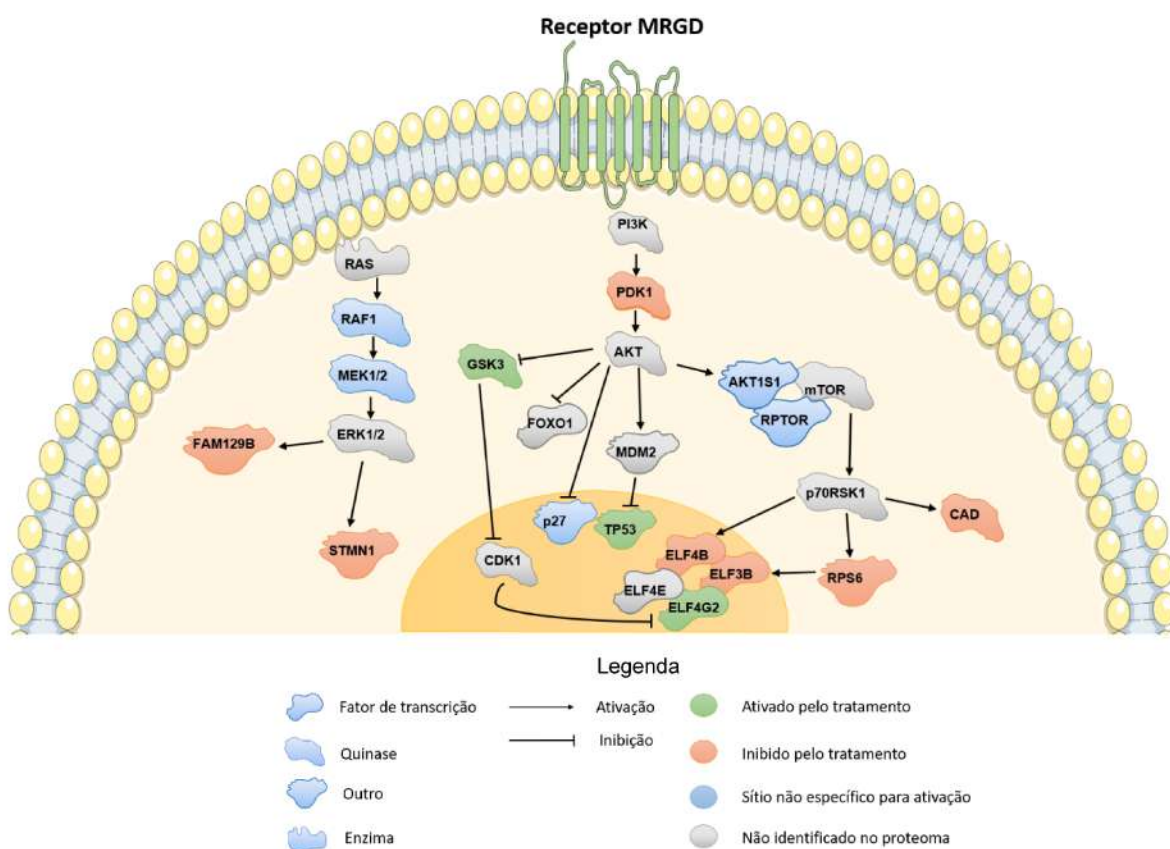
#### **1.4 Alamandina**

A alamandina, peptídeo recentemente descrito por nosso grupo, é um novo potencial alvo de pesquisa como agente antitumoral, dada sua similaridade em efeitos biológicos quando comparada à ang-(1-7). Segundo Lautner et al. (2013), a alamandina é um heptapeptídeo que pode ser formado com a hidrólise do resíduo fenilalanina da porção C-terminal da angiotensina A pela ECA<sub>2</sub> ou atividade de uma descarboxilase ainda não descrita, sobre o aspartato N-terminal da ang-(1-7) em alanina. Os autores mostraram que a alamandina pode ser formada endogenamente em coração de ratos após perfusão coronariana de ang-(1-7) e está presente no plasma humano. Também, analogamente a ang-(1-7), apresentou um hipotético papel patofisiológico devido ao aumento da sua concentração plasmática em pacientes portadores de nefropatia. Foi observada vasodilatação em anéis de aorta de ratos e camundongos tratados com alamandina, modulação da sensibilidade do componente bradicárdico do barorreflexo após infusão intracerebroventricular (ICV); aumento pressórico pela administração da alamandina na medula rostral ventrolateral (RVLM) e redução pressórica quando administrada na medula caudal ventrolateral (CVLM). Marques *et al.* (2011) indicaram a redução da deposição de colágeno tipo I e III e fibronectina pela administração diária desse peptídeo em ratos tratados com isoproterenol. Lautner et al, (2013) supuseram que a alamandina promoveria suas atividades biológicas através do mesmo receptor da ang-(1-7), MAS. A hipótese foi refutada, pois o efeito vasodilatador do primeiro peptídeo foi mantido quando utilizado o bloqueador específico do receptor MAS, o A779. Além disso, tal efeito foi preservado em anéis de aorta de animais que não expressavam o receptor da ang-(1-7) (Mas knockout). Gembardt F. *et al.* (2008) mostraram que a ang-(1-7) é um ligante fraco de outro membro da família de receptores acoplados a proteína G relacionados ao MAS, o MrgD. A hipótese que a alamandina seria um ligante do receptor MrgD foi testada, sendo comprovada pela ligação do heptapeptídeo com marcação fluorescente (FAM-alamandina) em células de ovário de hamster transfectadas com o receptor MrgD (CHO-MrgD); o mesmo não ocorreu em células CHO não transfectadas, nem em células transfectadas com o receptor MAS. A ligação foi inibida pela  $\beta$ -alanina, um conhecido aminoácido ligante do

MrgD e pelo estímulo com D-Pro7-ang-(1-7) (D-Pro), outro antagonista do receptor MAS; o que não ocorreu com o A-779 (Shinohara et al. 2004).

Em nosso grupo, testamos o possível efeito antiproliferativo da alamandina. Testes *in vitro* indicaram efeito antiproliferativo e inibição da migração de células tumorais (Mia PaCa-2 – carcinoma pancreático humano). Através de abordagem fosfoproteômica (LC-MS/MS), foi possível identificar um total de 475 fosfoproteínas estatisticamente reguladas pela alamandina em linhagem tumoral humana. Nessa linhagem celular, o tratamento inibiu a atividade de diversos efetores das vias da PI3K/AKT1 e das MAP cinases, além de ativar importantes supressores tumorais como a fosfatase PTEN e o fator de transcrição FoxO1 (Silva, 2016). Assim, hipotetizamos que, semelhante à ang-(1-7), a alamandina apresenta efeito antitumoral e anticaquético.

**Figura 4:** Representação esquemática da rede de fosforilação envolvida no efeito antiproliferativo da Alamandina em célula tumoral humana.



**Fonte:** Criado com dados da pesquisa utilizando componentes gráficos disponíveis em *Servier Medical Art* (<http://www.servier.com/Powerpoint-image-bank>).

## **2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVO**

### **2.1 Justificativa e Objetivo Geral**

O câncer de pele é uma das malignidades mais comuns, com incidência crescente a cada ano, sendo identificado como o mais frequente no Brasil segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA). É um tipo de neoplasia com altas taxas de metastatização e prognóstico ruim nos casos avançados da doença. Muitos tumores, em estado avançado, levam a complicações extra tumorais por uma inflamação sistêmica e desequilíbrio metabólico geral. A caquexia é uma das complicações advindas de neoplasias em estado avançado e resistentes ao tratamento quimioterápico.

Pouco se sabe a respeito da fisiopatologia da caquexia relacionada ao câncer. Acredita-se que o processo tenha início a partir de citocinas inflamatórias secretadas pelas células tumorais, como fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleucina 6 (IL-6) (Loumaye e Thissen 2017). Além disso, a participação do Sistema Renina Angiotensina (SRA) nesse processo já foi descrita, sendo o eixo ECA/angII/AT1 responsável por degradação proteica em diferentes patologias musculares (Yoshida e Delafontaine 2015), enquanto o eixo ECA2/ang-(1-7) /Mas tem demonstrado efeitos mioprotetores em condições de sarcopenia relacionada ao estado caquético (Murphy et al. 2019). Adicionalmente, em nosso grupo já foi mostrado o efeito antiproliferativo *in vitro* de outro peptídeo desse sistema, a alamandina (Silva, F, 2016). Sendo a alamandina um peptídeo com efeitos biológicos semelhantes aos descritos para ang-(1-7), o objetivo principal deste trabalho foi investigar e descrever o potencial efeito antitumoral e anticaquético da alamandina em um modelo de melanoma murino.

## **2.2      Objetivos Específicos**

1) Avaliar o efeito de concentrações crescentes do heptapeptídeo alamandina sobre a proliferação de células B16F10 *in vitro*;

2) Avaliar o efeito da administração oral (gavagem) de alamandina incluída em ciclodextrina (HP $\beta$ CD - *hidroxipropil-betaciclodextrina*) nas doses 30, 50 e 100  $\mu$ g/Kg/dia sobre o crescimento tumoral *in vivo* utilizando modelo de tumor heterotópico singênico em camundongos C57BL/6J, comparando-se com animais tratados com HP $\beta$ CD (ciclodextrina vazia);

3) Comparar o nível plasmático e tecidual tumoral de alamandina e outros peptídeos do SRA em camundongos tratados com alamandina e ciclodextrina vazia;

4) Avaliar o índice de caquexia em animais portadores de tumor tratados com alamandina ou ciclodextrina vazia;

5) Avaliar a força muscular pelo desempenho no teste de força invertido dos animais portadores de tumor tratados com alamandina ou ciclodextrina vazia;

6) Avaliar parâmetros metabólicos de animais portadores de tumor tratados com alamandina ou ciclodextrina vazia.

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Cultura de células**

As linhagens celulares B16F10 (melanoma murino) e C2C12 (mioblasto murino) foram cultivadas em meio DMEM-F12 suplementado com 10% (v/v) de Soro Fetal Bovino (SFB) inativado (Gibco, Brasil), 1% de antibióticos (10.000 unidades de penicilina/mL, 10 mg estreptomicina/mL e 25 mg anfotericina B/mL) (Gibco, Brasil), a 37°C em estufa de CO<sub>2</sub> a 5%. Para ensaios biológicos foram utilizadas células entre a quinta e décima passagem.

#### **3.2 Teste de viabilidade celular**

Para caracterizar a atividade da alamandina na linhagem de melanoma murino foi utilizado o método de redução de sais de tetrazólio (MTT) (Mosmann 1983). Uma suspensão celular foi semeada em placas de poliestireno de 96 cavidades nas densidades de  $2 \times 10^3$  células/poço; em 100 µL de meio de cultura. Após adesão celular à superfície das cavidades, as células foram expostas a doses crescentes do peptídeo alamandina ( $10^{-9}$  a  $10^{-4}$  M), por 72 horas. Células não tratadas foram utilizadas como controle e poços sem células como o branco do experimento. Ao final do estímulo, foi adicionado novo meio contendo 10% de uma solução de sal de MTT (5 mg/mL) (Sigma-Aldrich, EUA) em cada cavidade e após 4 horas realizada a leitura espectrofotométrica (570 nm com 650 nm como referência). As médias aritméticas das densidades óticas (D.O.) obtidas para os controles foram consideradas como 100% de viabilidade celular e a porcentagem de células viáveis nos poços tratados foi calculado pela média das densidades óticas, dividido pela D.O. do controle, vezes 100.

#### **3.3 Ensaio clonogênico**

O ensaio clonogênico ou ensaio de formação de colônias *in vitro*, é um teste de sobrevivência celular baseado na habilidade de uma única célula de crescer e formar uma colônia (Franken et al. 2006). Para o experimento, um número mínimo de 50 células pode ser considerado uma colônia (Figura 5). Para a realização do experimento células B16F10 foram contadas e distribuídas em placas de 6 poços, 100 células por poço. Para determinar o efeito da alamandina na formação de colônias, poços teste foram tratados por 72 horas com alamandina na

concentração de 1 $\mu$ M (10<sup>-6</sup>M) ou 100nM (10<sup>-7</sup>M). Células não tratadas foram utilizadas como controle do experimento. Após este período o meio de cultura foi substituído por meio fresco e as células foram mantidas em cultura por 7 dias para observação da formação de colônias celulares. Ao final, os poços foram lavados com PBS e as células foram fixadas e coradas por uma hora com uma mistura de 6% glutaraldeído e 0,5% cristal violeta (Franken et al. 2006). Para remoção do excesso de corante, os poços foram cuidadosamente lavados com água e deixados para secar em temperatura ambiente. Finalmente, para comparação, as colônias foram contadas manualmente e a fração de sobrevivência calculada como mostrado abaixo (Franken et al. 2006):

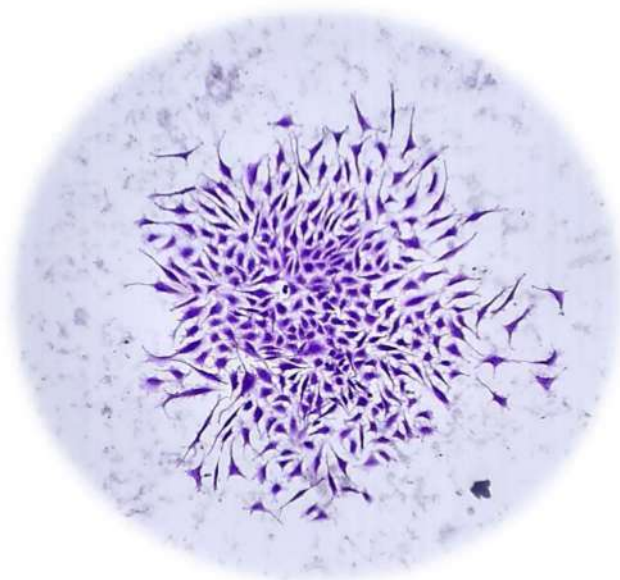
$$PE = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ de colônias do controle}}{\text{n}^{\circ} \text{ de células plaqueadas}}$$

$$SF = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ de colônias formadas após o tratamento}}{\text{n}^{\circ} \text{ de células plaqueadas} \times PE}$$

Abreviações: PE, eficiência de plaqueamento (do inglês – *plating efficiency*); SE, fração de sobrevivência (do inglês – *surviving fraction*); n<sup>o</sup>, número.

Foram feitos três experimentos independentes, resultando em eficiência de plaqueamento igual a 54%.

Figura 5. Imagem representativa de uma colônia formada por células B16F10 após 7 dias de cultivo; coradas com cristal violeta.



Fonte: Fotografia obtida de experimentos desta tese.

### **3.4 Animais**

Nesse estudo foram utilizados camundongos C57B/6J entre 8 a 10 semanas provenientes do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais - CEBIO. Os animais foram mantidos em ambiente com luz e temperaturas controladas (período de claro/escuro de 12/12 h) e alimentados com ração e água filtrada *ad libitum*. CEUA: 198/2018

#### **3.4.1 Modelo de melanoma murino heterotópico singênico**

Para indução de formação tumoral, foi preparada uma suspensão de células B16F10 ( $5 \times 10^6$  células/mL) em DPBS estéril. Após tricotomia e higienização com álcool 70% na região do flanco direito dos animais, um volume de 100  $\mu$ L (cinco  $\times 10^5$  células/animal), foi injetado via subcutânea (s.c.) (Overwijk e Restifo 2001). Após cerca de cinco dias, confirmando-se a formação de pequeno tumor palpável (Figura 6), os indivíduos foram aleatorizados nos grupos experimentais (n=5 a 8 animais por grupo).

Figura 6. Imagem representativa da formação inicial de tumor sólido após implantação de células B16F10 em camundongos C57BL/6J (seta vermelha).

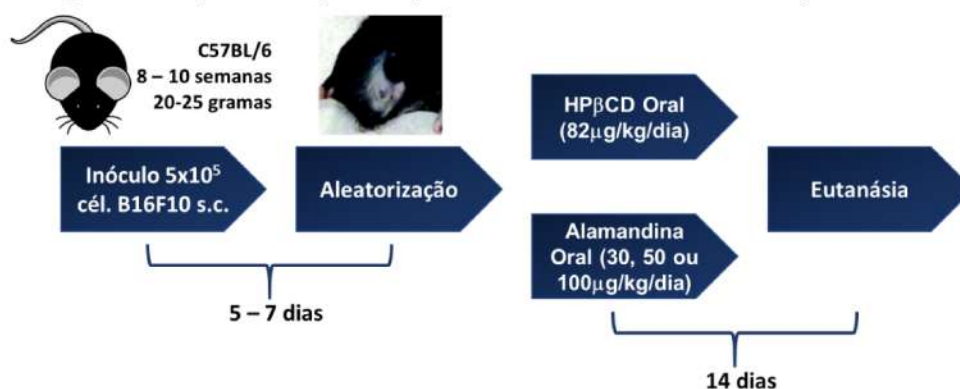


O tratamento foi realizado por gavagem, sendo continuado diariamente por 14 dias (Figura 7). Para efeito comparativo, foram feitos os seguintes grupos experimentais:

1. Controle não tumoral: camundongos C57BL/6J saudáveis sem nenhum procedimento;
2. Controle tumoral: camundongos C57BL/6J com inoculação tumoral tratados diariamente com ciclodextrina vazia na dose de 82 $\mu$ g (média da ciclodextrina recebida pelos demais grupos) (HP $\beta$ CD 82 $\mu$ g/Kg/dia);
3. Ala30: camundongos C57BL/6J com inoculação tumoral tratados diariamente com alamandina na dose de 30 $\mu$ g (30 $\mu$ g/Kg/dia);
4. Ala50: camundongos C57BL/6J com inoculação tumoral tratados diariamente com alamandina na dose de 50 $\mu$ g (50 $\mu$ g/Kg/dia);
5. Ala100: camundongos C57BL/6J com inoculação tumoral tratados diariamente com alamandina na dose de 100 $\mu$ g (100 $\mu$ g/Kg/dia).



Figura 7. Representação esquemática de delineamento experimental.



Os animais foram pesados a cada dois dias para acompanhamento da variação da massa corporal e reajuste das concentrações. O crescimento tumoral foi acompanhado com utilização de paquímetro e o volume tumoral estimado pela fórmula dos esferoides ( $\text{Volume} = (\text{Comprimento} \times \text{Largura}^2) \times 0,52$ ) (Goto et al. 2000). Ao final dos 14 dias, os animais foram sacrificados para mensuração do tamanho e peso finais dos tumores e comparação entre os grupos. Para mensuração da taxa de inibição do crescimento tumoral (*TWI - tumor weight inhibition*) nos grupos alamandina, foi utilizada a fórmula abaixo:

$$TWI\% = \frac{C - T}{C} \times 100$$

Sendo:

TWI% = Inibição tumoral (%)

C = Média da massa tumoral final do grupo controle (g)

T = Média da massa tumoral final do grupo tratado (g)

Os músculos gastrocnêmio, tibial anterior, extensor longo dos dedos (EDL) e sóleo; gordura epididimal, coração, fígado e baço foram coletados para avaliação do estado de caquexia dos animais. Os tecidos foram devidamente armazenados em freezer -80°C para posteriores análises.

### **3.4.2 Mensuração da atividade de metaloproteinases (MMPs) no tecido tumoral**

Sabe-se que a ang-(1-7) modula a expressão de metaloproteinases 2 e 9 (MMP2 e MMP9) em modelos de tumor sólido em camundongos, inibindo o crescimento tumoral e metástase (Wan 2011). Para verificar a atividade de metaloproteinases nos grupos estudados, foi utilizada a técnica de zimografia. A zimografia permite mensurar as formas latentes e ativas das metaloproteinases, com sensibilidade para diferentes classes de MMPs, dependendo do substrato utilizado para o método. A metodologia foi utilizada conforme previamente estipulada por (Kupai, 2011). Aproximadamente 50mg de tecido tumoral foi homogeneizado em tampão (50mM Tris base, 0,5% Triton, pH7.4). O extrato proteico foi separado por centrifugação (14.000 RPM, 4° C, 15 min) e o conteúdo proteico mensurado pela técnica de Bradford (Bradford 1976). Para cada animal, 30µg de proteína total foram condicionados em tampão de carregamento não redutor (250 mM Tris-HCl, pH 6.8; 40% glicerol; 8% SDS; e 0.01% bromofenol blue em água), e pipetados em canaletas de gel de eletroforese contendo 1mg/ml (p/v) de gelatina tipo A. Terminada a eletroforese, o gel foi lavado com Triton X-100 2,5% para remoção do SDS e renaturação das proteínas. Após 24h de incubação em tampão de desenvolvimento para ativação das metaloproteinases (1% Triton-X100, 50 mM Tris HCl, 0.15 M NaCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>), o gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue (0.05% em 2,5:1:6,5 metanol ;ácido acético; água) e o excesso de corante removido com solução descolorante (Metanol 4%, Ácido acético 8% em água) para observação das bandas com presença de atividade gelatinolítica relacionada à ativação das MMPs (Kupai, 2011)

### **3.4.3 Quantificação plasmática e tecidual de alamandina e peptídeos do Sistema Renina Angiotensina**

Visando mensurar os níveis plasmáticos de alamandina, ang-(1-7), angII e angI, amostras de sangue de cada animal foram coletadas em coquetel de inibidores de proteases: 10 µl de p-hidroxi-benzoato de mercúrio (POOH) 1mM, diluído em solução salina 9% estéril; 50 µl de o-fenantrolina 30mM, diluído em etanol 3,5%; 10 µl de para- metilsulfonil fluoreto (PMSF) 1mM , diluído em metanol 50%; 50 µl de EDTA a 7,5%, diluído em água deionizada; e 20 µl de

pepstatin A 1 mM, diluído em etanol– 140 µL de coquetel para cada 1ml de sangue (Marques et al. 2011). O plasma foi separado por centrifugação (5000 x RPM a 4°C por 15 minutos) e armazenado a –80°C até a utilização. Os peptídeos foram isolados utilizando cartuchos de extração em fase sólida (SPE – em inglês *solid phase extraction*) HF Bond Elut C18 (Variant, Palo Alto, CA, EUA) por pressão negativa em coletor a vácuo Visiprep™ SPE (Sigma-Aldrich, EUA) (Figura 8). A resina C18 dos cartuchos foi ativada por duas lavagens sequenciais com 10 mL de acetonitrila 99% (ACN) / ácido trifluoroacético 0,1% (TFA), seguido por 10 mL de TFA 0,1%. Em seguida, a resina foi lavada com 3 mL de 0,1% de TFA / 0,1% de soro albumina bovina (BSA – do inglês *bovine serum albumin*), 10 mL de 10% de acetonitrila / 0,1% de TFA e 3 mL de 0,1% de TFA. A amostra ( $\cong$  500µl) foi carregada e lavada com 20 mL de 0,1% de TFA e, em seguida, 3 mL de 20% de acetonitrila / 0,1% de TFA. Os peptídeos foram eluídos em 3 mL de 99% ACN / 0,1% TFA em tubos de polipropileno saturado com 0,1% BSA (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) e as amostras foram completamente secas em centrífuga evaporadora *SpeedVac* (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha).

Figura 8. Método de extração em fase sólida utilizando cartuchos com resina C18 e coletor à vácuo Visiprep™ SPE. Nos quatro primeiros cartuchos podemos ver a resina (de coloração amarelada) já com os peptídeos amostrais interagidos. Nos últimos dois cartuchos (de coloração branca) podemos ver a resina ainda não interagida e a amostra (plasma) depositada previamente à extração à vácuo.



Cada amostra foi ressuspensa em 50  $\mu\text{L}$  de água Milli-Q, 0,1% ácido fórmico (fator de concentração da amostra = 10 vezes) e, em seguida, carregada (10  $\mu\text{L}$ ) no sistema ACQUITY I-Class UPLC (Waters, Milford, MA, EUA) acoplado à ionização por eletropulverização (ESI – do inglês *electrospray ionization*) espectrometria de massa em tandem (LC-ESI-MS / MS Xevo TQ-S (Waters, Milford, MA, EUA). A separação cromatográfica foi feita em uma coluna C18 (coluna ACQUITY UPLC BEH C18, 130Å, 1,7  $\mu\text{m}$ , 2,1 mm X 100 mm, Waters, Milford, MA, EUA) e cada cromatografia durou 5,5 min. A cromatografia foi obtida com gradiente das fases móveis (Tabela 1): solvente A1 (0,1% ácido fórmico em  $\text{H}_2\text{O}$  Milli-Q) e o solvente B1 (ácido fórmico a 0,1% em ACN). O gradiente cromatográfico foi como segue na tabela:

Tabela 1: Gradiente cromatográfico das fases móveis A1 (0,1% ácido fórmico em  $\text{H}_2\text{O}$  Milli-Q) e B1 (ácido fórmico a 0,1% em ACN) em função do tempo em minutos.

<b>Tempo (min)</b>	<b>Fluxo (ml/min)</b>	<b>%A1</b>	<b>%B1</b>
0	0.3	97	3
3.5	0.3	60	40
3.51	0.3	1	99
4.5	0.3	1	99
4.51	0.3	97	3
5.5	0.3	97	3

Para obtenção dos espectros de massas, os principais parâmetros foram os seguintes: i) capilar = 3,5 kV; ii) cone = 20V; iii) temperatura do gás de dessolvatação (hidrogênio) = 550 oC. A energia de colisão (CE) (gás argônio) foi ajustada para cada peptídeo alvo abrangendo de 10 a 20 CE. As transições monitoradas pela espectrometria de massas (MS – do inglês *mass spectrometry*) no modo de monitoramento de reação seletiva (SRM – do inglês *Selective Reaction Monitoring*) foram como segue (Tabela 2):

Tabela 2: Transições monitoradas pela espectrometria de massas no modo de monitoramento de reação seletiva (SEM) para os peptídeos ang-(1-7), angII, angI e alamandina.

<b>Analito</b>	<b>Transição [m/z]</b>	<b>Dwell time [ms]</b>	<b>Cone [V]</b>	<b>Energia de colisão [V]</b>
ang-(1-7)	300.8 → 110.1	65	20	23
	300.8 → 371.2		20	7
angII	349.7 → 255.2	65	20	19
	349.7 → 371.2		20	9
angI	433.2 → 647.4	75	20	15
Alamandina	286.1 → 136.1	65	20	15
	286.1 → 327.2		20	8

Abreviações: m/z: relação massa carga; ms: milissegundos, V: voltagem.

Os dados foram adquiridos através do software MassLynx™ (Waters, Milford, MA, EUA) e a quantificação foi realizada pela interpolação das áreas das amostras com as áreas de uma curva de calibração obtida através de uma solução com todos os peptídeos sintéticos a 1ng/ml. O mesmo procedimento foi realizado para quantificar os peptídeos no tecido tumoral excisado. Para tal, aproximadamente 50mg de tecido de cada animal foi homogeneizado em tampão de inibidores de proteases (em gelo) e as proteínas foram quantificadas pelo método de Bradford (Bradford 1976). Após extração em colunas C18, as amostras foram analisadas também por espectrometria de massas.

### **3.5 Avaliação do potencial efeito anticaquético da alamandina**

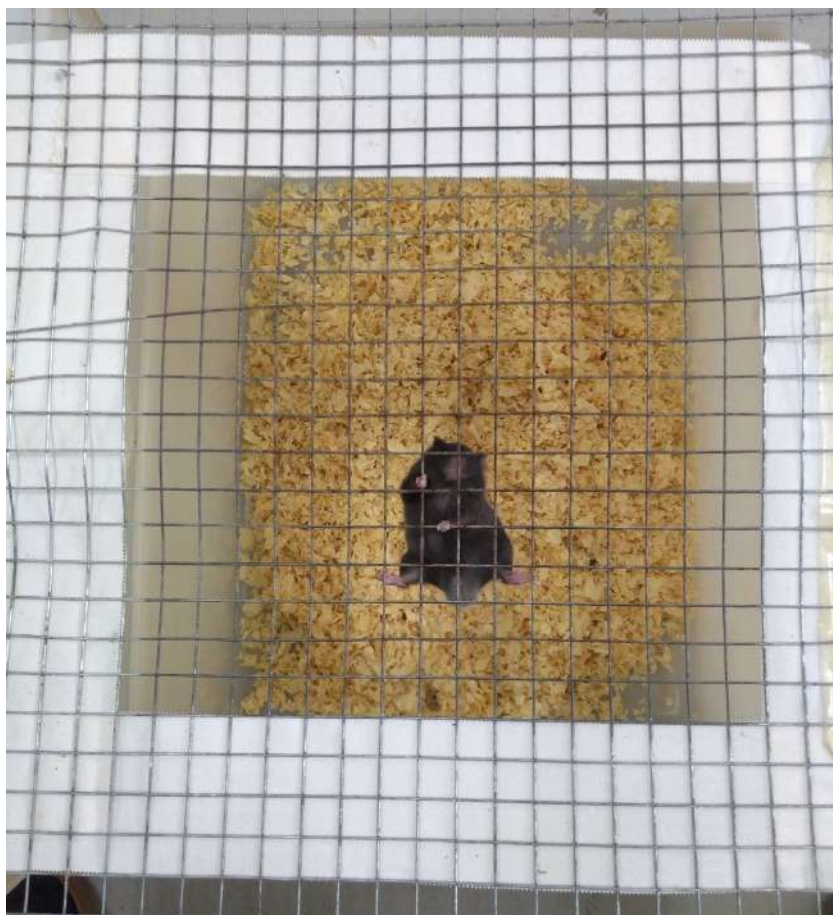
Para avaliação do efeito da alamandina sobre o trofismo muscular de camundongos portadores de tumor, a massa dos músculos gastrocnêmio, sóleo e tibial anterior; gordura epididimal, coração, fígado e baço foram corrigidos pelo peso inicial de cada animal e comparados entre os grupos. Devido às alterações tróficas provocadas pelo tumor, os valores foram expressos como porcentagem da massa do órgão/músculo em relação à massa corporal inicial. Animais sem indução de tumor (CT) foram utilizados como controle saudável (não caquético). O índice de caquexia foi calculado

pela fórmula:  $[(\text{Peso inicial} - \text{peso final} + (\text{massa do tumor}) + \text{ganho de peso do controle}) \times 100 / (\text{peso inicial} + \text{ganho de peso do controle})]$  (Martins et al. 2016). Animais com índice acima de 5% foram considerados caquéticos. (K. Fearon et al. 2011)

### 3.5.1 Teste de força

O teste de força Kondziela (Deacon et al. 2013) foi realizado ao final dos 14 dias de tratamento para comparar a força muscular dos animais e relativizar ao índice de caquexia entre os grupos. Os animais foram ambientados (15-20 minutos) na sala de realização do teste. Foi utilizada uma grade metálica com espaçamento de 1 cm entre barras (Figura 9). Inicialmente o animal foi colocado sobre a grade, a qual foi brevemente agitada para que o animal a agarrasse. A grade foi então invertida e mantida 20 cm acima de uma caixa preenchida com maravalha. A latência para queda foi medida com o uso de um cronômetro. Utilizando-se animais controle (sem indução tumoral) foi estabelecido um teto de 200 segundos.

Figura 9: Grade utilizada para o teste de força Kondziela (Deacon et al. 2013).



### **3.5.2 Mensuração de parâmetros séricos**

Ao final do período de tratamento, a glicemia dos animais foi mensurada com glicosímetro de fita e, uma amostra de 10µl de plasma de cada camundongo foi utilizada para dosagem de triglicerídeos e lactato com kits comerciais (Labtest). A concentração de glicogênio hepático e muscular foi mensurada com adaptações ao método proposto por Carroll e colaboradores (1956) (Carroll, Longley, e Roe 1956). Para tal, amostras de fígado ( $\cong$  1g) e gastrocnêmio ( $\cong$  50mg) foram hidrolisadas por fervura em tubos de vidro contendo 2 ml de hidróxido de potássio (KOH) a 30% por uma hora. Após fervura foi adicionado 5 gotas de sulfato de sódio saturado (16g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> em 50 ml de água). O glicogênio, insolúvel em álcool, foi precipitado com adição de 4,5ml de etanol absoluto (ETOH), agitação com bastão de vidro e aquecimento em banho-maria. As amostras foram centrifugadas (2000 x RPM por 10 minutos) para remoção do sobrenadante. Os precipitados de glicogênio foram ressuspendidos em 2 ml de água destilada e o processo de adição de álcool e centrifugação repetido mais duas vezes para purificação das amostras. Após a terceira centrifugação, cada amostra foi diluída em 10 ml (fígado) ou 2 ml (gastrocnêmio) de água destilada para análise. Um ml de cada amostra foi aliquotado e, cuidadosamente, foi adicionado 2 ml de uma solução de antrona (0,2g de antrona em ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 95%), aquecido em banho-maria e resfriado para leitura. O glicogênio é hidrolisado pelo ácido em furfurais e hidroximetilfurfural (HMF) que são condensados pela antrona formando um complexo esverdeado que pode ser detectado a 620-630nm. Após resfriamento das amostras, a absorvância foi medida a 620 nm, e as concentrações foram estimadas por regressão linear comparando-se com valores de uma curva padrão de glicose. Os valores colorimétricos foram convertidos para mg de glicogênio por g de tecido utilizando o fator de correção de glicose para glicogênio (FC: 0,9), que considera a diferente complexidade entre a glicose e o glicogênio. Os resultados foram expressos em mg de glicogênio por 100 mg de tecido (%).

### **3.5.3 Avaliação do efeito da alamandina na viabilidade de células C2C12**

A linhagem celular C2C12 é comumente utilizada para modelos de atrofia muscular e caquexia *in vitro* (Stevenson et al. 2005). Essa linhagem pode ser diferenciada de mioblastos para miotubos maduros possibilitando a avaliação *in vitro* de compostos que interfiram na viabilidade e trofismo de células musculares. Nesse estudo, células C2C12 foram crescidas em placa de 96 poços (3.000 células por poço) e diferenciadas pela adição do meio de diferenciação (DM – do inglês *differentiation media*). Após 4 dias, as células maduras foram expostas à fatores pró-atrofia: meio condicionado por células B16F10 (CM – do inglês *conditioned media*) (Leal et al. 2021) ou angiotensina II (Yoshida e Delafontaine 2015). O meio condicionado foi obtido pela adição de meio DMEM sem soro em garrafa de cultura contendo células B16F10 confluentes, por 24 horas. Após o período de incubação, o meio foi coletado, centrifugado para remoção de células em suspensão e congelado a -80°C para posterior uso. O método de análise de viabilidade celular foi o mesmo descrito no item 3.2.

## **4 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

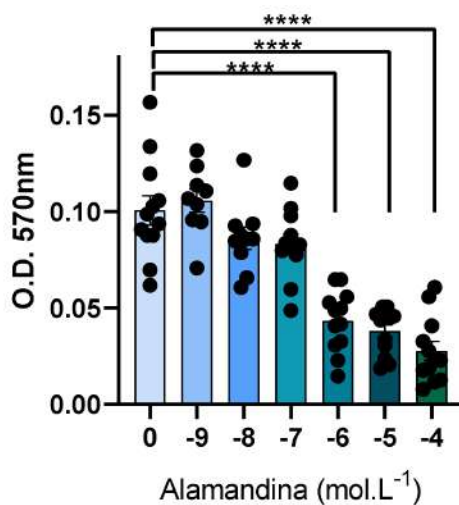
Os dados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M). A avaliação estatística dos dados obtidos foi realizada através do teste t-Student, análise de variância (ANOVA), com pós-teste de Tukey, ou análise de variância de duas variáveis (Two-way ANOVA) seguida do teste de Bonferroni. As análises foram feitas utilizando-se o software GraphPad Prism 8.3 admitindo níveis de significância com  $p < 0,05$ .



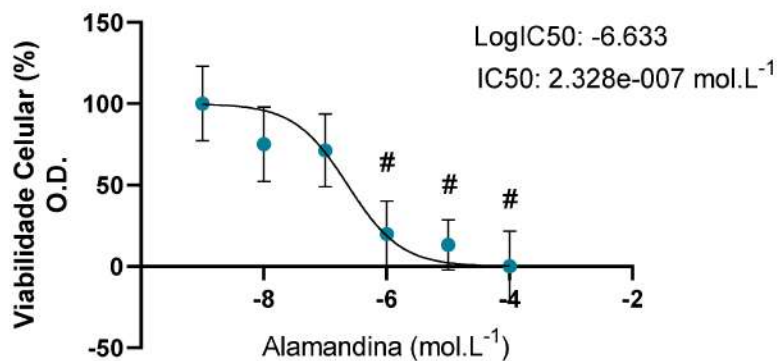
## 5 RESULTADOS

### 5.1 Efeito da Alamandina na viabilidade celular da linhagem B16F10

A viabilidade celular da linhagem B16F10 foi mensurada após 72h de exposição a concentrações crescentes de alamandina (1nM a 100 $\mu$ M) e, por regressão linear, foi estimada a IC50 para o peptídeo. A inibição do crescimento celular foi estatisticamente diferente a partir da concentração de 1 $\mu$ M (Figura 10). A partir da regressão linear utilizando o software GraphPad Prism 8.3, a IC50 foi estimada em 232nM (Figura 11). Trabalhos prévios investigando a atividade antiproliferativa da ang-(1-7) tem baseado seus modelos experimentais na dose de 100nM para inibição do crescimento de células de adenocarcinoma pulmonar A549 (Gallagher 2004), inibição da migração de células A549 (Wan 2011) e inibição do crescimento de células de tumor prostático PC3 (Krishnan, Smith, et al. 2013) em linhagem tumoral de adenocarcinoma pulmonar humano.



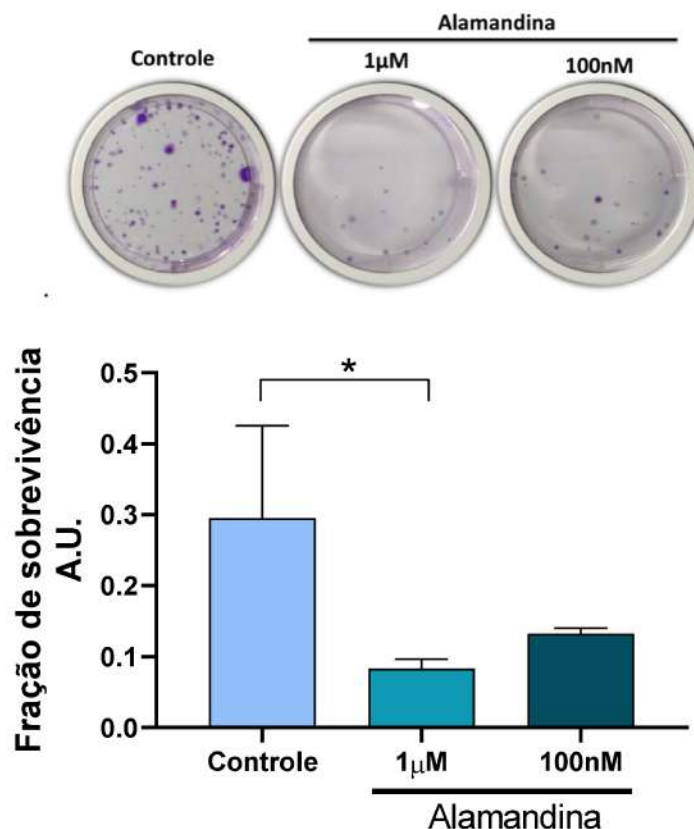
**Figura 10:** Viabilidade de células B16F10 expostas a Alamandina. Densidades ópticas obtidas pelo método de MTT de três experimentos em quadruplicata, apresentadas como média  $\pm$  E.P.M. One-way ANOVA seguido do teste de comparação múltipla de Dunnet (A) (\*\*\*\* P <0,001).



**Figura 11:** Regressão linear para cálculo da IC50 teórica da alamandina em células B16F10. One-way ANOVA seguido do teste de comparação múltipla de Dunnet (A) (# P <0,001 em relação ao grupo controle).

## 5.2 Efeito da Alamandina na formação de colônias de células B16F10 *in vitro*

Assim como o ensaio de viabilidade por MTT, o teste de formação de colônias foi proposto para avaliar o comportamento de células B16F10 na presença de alamandina. O ensaio clonogênico demonstrou que o na concentração de 1 $\mu$ M, o peptídeo foi capaz de reduzir a formação de colônias celulares em comparação com células não tratadas (Figura 12). Também é observada a diminuição no número de colônias na concentração de 100nM, entretanto sem diferença estatística.



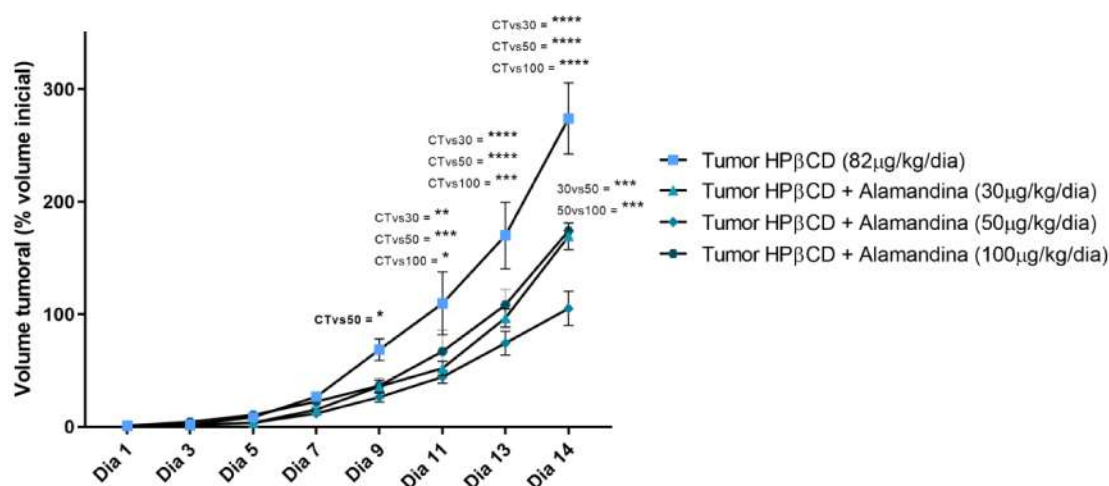
**Figura 12:** Ensaio de formação de colônias de células B16F10 expostas a Alamandina. Fração de sobrevivência calculado pelo número de colônias formadas após 7 dias de cultivo de três experimentos independentes, apresentadas como média  $\pm$  E.P.M. One-way ANOVA seguido do teste de comparação múltipla de Dunnet (A) (\* P <0,05).

### 5.3 Efeito da administração oral de Alamandina no crescimento tumoral

A partir dos resultados de viabilidade de células B16F10 expostas a alamandina, foi proposto investigar se o peptídeo tem atividade antitumoral em modelo de tumor sólido murino. Para tal, camundongos C57BL/6J foram inoculados no flanco direito com células de melanoma murino - B16F10 - e tratados por gavagem com alamandina incluída ciclodextrina em diferentes concentrações (30, 50 e 100  $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{dia}$ ) ou ciclodextrina vazia. Como mostrado na figura 13, os volumes dos implantes tumorais eram similares no dia 1 (HP $\beta$ CD  $5,31 \pm 2,22 \text{mm}^3$ ; Ala30 $\mu\text{g}$   $7,29 \pm 1,99 \text{mm}^3$ ; Ala50 $\mu\text{g}$   $6,98 \pm 2,63 \text{mm}^3$ ; Ala100 $\mu\text{g}$   $9,10 \pm 1,82 \text{mm}^3$ ). Ao longo dos dias houve notável crescimento do volume tumoral no grupo HP $\beta$ CD, já havendo diferença estatística quando

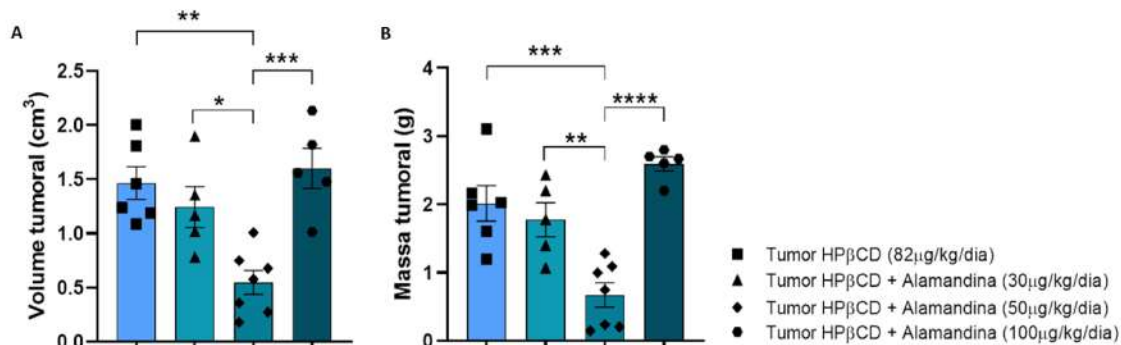


comparado ao grupo Ala50 $\mu$ g a partir do nono dia (HP $\beta$ CD 352,56 $\pm$ 195,35mm<sup>3</sup>; Ala50 $\mu$ g 192,07 $\pm$ 97,92mm<sup>3</sup>). Em todos os grupos tratados com alamandina o crescimento tumoral foi estatisticamente menor quando comparado com o grupo ciclodextrina vazia a partir do décimo primeiro dia (HP $\beta$ CD 585,27 $\pm$ 261,37mm<sup>3</sup>; Ala30 $\mu$ g 395,16 $\pm$ 206,67mm<sup>3</sup>; Ala50 $\mu$ g 297,03 $\pm$ 122,87mm<sup>3</sup>; Ala100 $\mu$ g 596,27 $\pm$ 396,88mm<sup>3</sup>), com inibição progressiva do crescimento tumoral. No décimo quarto e último dia os animais do grupo Ala50 $\mu$ g apresentaram inibição mais eficaz que os demais grupos alamandina. As doses de 30 e 50 $\mu$ g de alamandina apresentaram índices de inibição tumoral 11,85 e 63,82%, respectivamente (Figura 14). O volume tumoral final médio para os grupos foi: HP $\beta$ CD 1,464 $\pm$ 0,3686cm<sup>3</sup>; Ala30 $\mu$ g/Kg/dia 1,245 $\pm$ 0,4211 cm<sup>3</sup>; Ala50 $\mu$ g/Kg/dia 0,5462 $\pm$ 0,2929 cm<sup>3</sup> e Ala100 $\mu$ g/Kg/dia 1,601 $\pm$ 0,4157 cm<sup>3</sup>. (Figura 14.A) A massa final do tumor excisado foi como segue: HP $\beta$ CD 2,015 $\pm$ 0,6376g Ala30 $\mu$ g/Kg/dia 1,776 $\pm$ 0,5584g Ala50 $\mu$ g/Kg/dia 0,6730 $\pm$ 0,4722g e Ala100 $\mu$ g/Kg/dia 2,595 $\pm$ 0,2317g (Figura 14.B). Curiosamente, o volume e massa tumoral final do grupo tratado com 100 $\mu$ g do peptídeo não apresentou diferença em relação ao grupo não tratado. Entretanto se compararmos relativamente (em porcentagem) o volume final em relação ao volume inicial de cada grupo, é possível constatar que no grupo Ala100ug também houve inibição do crescimento tumoral (Figura 13).



**Figura 13:** Progressão tumoral de implante singênico B16F10 em animais tratados por gavagem com alamandina incluída em HP $\beta$ CD (30, 50 e 100 $\mu$ g/Kg/dia em) em comparação com o grupo ciclodextrina vazia (HP $\beta$ CD). Valores representados pela alteração do tamanho tumoral (em porcentagem) em relação ao volume inicial (n=5

por grupo). 2way ANOVA seguido do teste de comparação múltipla de Tukey (\* P <0,05; \*\* P <0,01; \*\*\* P <0,005; \*\*\*\* P <0,001).



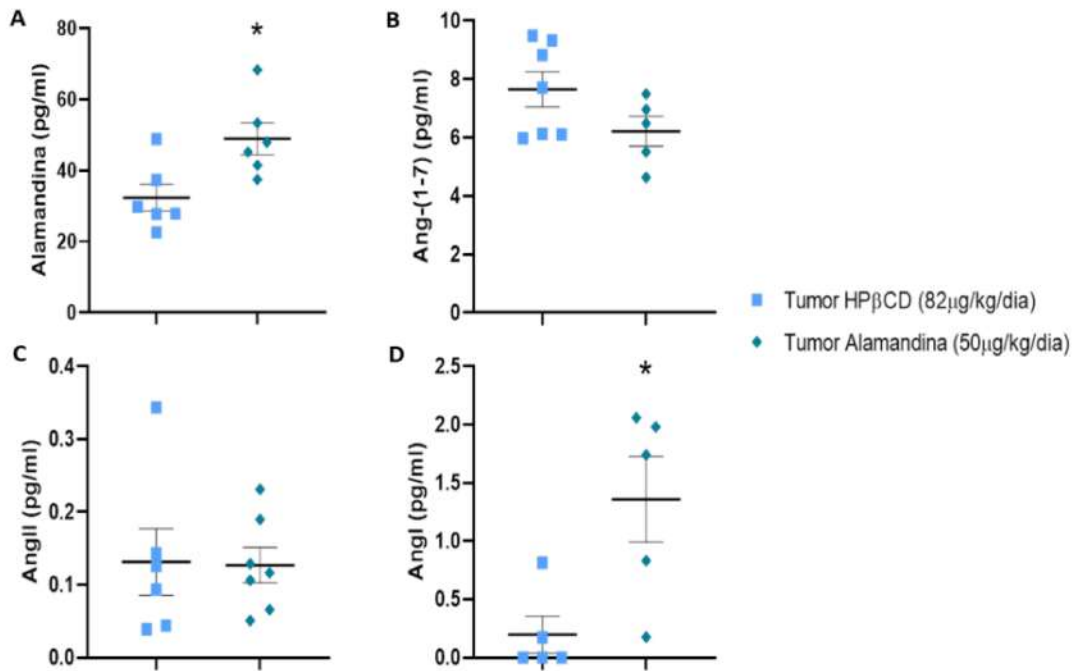
**Figura 14:** Representação gráfica do efeito da alamandina em modelo de tumor singênico murino. A. Volume tumoral final, medido após eutanásia com paquímetro e calculado pela fórmula dos esferoides ( $\text{Volume} = (\text{Comprimento} \times \text{Largura}^2) \times 0,52$ ). B – Massa tumoral final. Os dados são apresentados como a média  $\pm$  E.P.M (n=5 por grupo). One-way ANOVA seguido do teste de comparação múltipla de Tukey (\* P <0,05; \*\* P <0,01; \*\*\* P <0,005; \*\*\*\* P <0,001).

#### 5.4 Níveis plasmáticos e tecidual tumoral de Alamandina e peptídeos do SRA

Para verificar os níveis plasmáticos de alamandina e outros importantes peptídeos do Sistema Renina Angiotensina, plasma e tecido tumoral foram coletados e preparados em tampão de inibidores de proteases. Os peptídeos foram extraídos por cromatografia de fase reversa em colunas C18 e analisados em espectrômetro de massas acoplado a cromatografia líquida de ultra precisão (UPLC). Houve um leve aumento no volume circulante de alamandina nos animais tratados com o peptídeo (50μg/Kg/dia) quando comparado com animais portadores de tumor tratados apenas com ciclodextrina vazia (HPβCD 38,63±9,37pg/ml; Ala 50μg 48,99±10,94pg/ml). Também foi observado um aumento substancial do nível de angl (HPβCD 0,1975±0,3537pg/ml; Ala 50μg 1,358±0,8220pg/ml) (Figura 15). Quanto aos níveis desses peptídeos no tecido tumoral, considerando a quantidade de peptídeo em picograma por miligrama de tecido, houve diferença significativa apenas para angII (HPβCD 0,05421±0,02520pg.mg<sup>-1</sup>; Ala 50μg 0,02202±0,01689pg.mg<sup>-1</sup>) (Figura 16). Este é um fator que pode explicar, em parte, os mecanismo de inibição

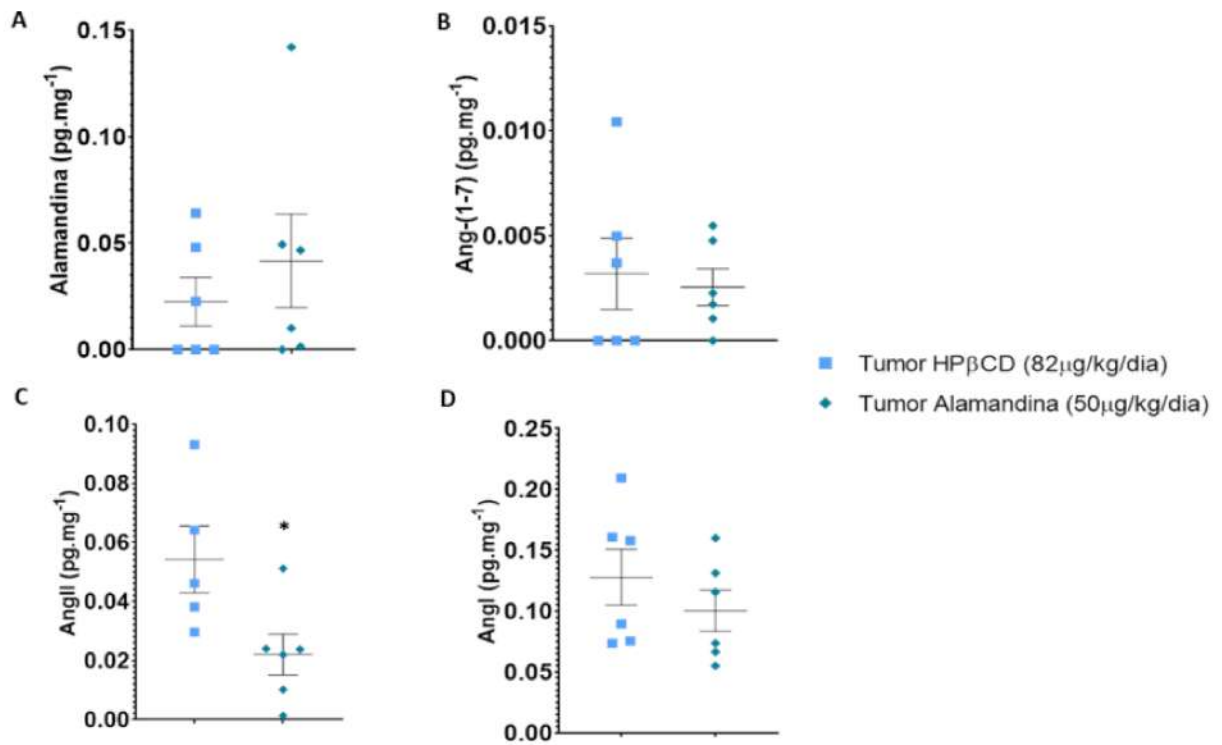
tumoral induzido pela alamandina, sabendo-se que a maior abundância de angII e seu receptor AT1 são comumente associadas à progressão tumoral e pior prognóstico em pacientes com neoplasias (George, Thomas, e Hannan 2010a).

Como mostrado na figura 17, podemos ver que existe uma correlação ( $p < 0.01164$ ) entre o volume tumoral e o a abundância tecidual tumoral de angII, sendo que quanto menor a concentração, menor o volume tumoral.

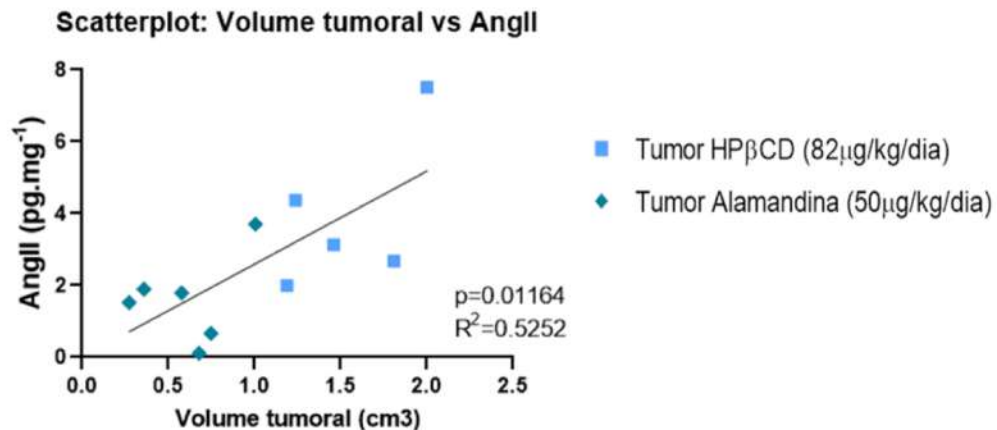


**Figura 15:** Níveis plasmáticos de peptídeos do SRA em animais portadores de tumor tratados com alamandina incluída em ciclodextrina comparados com animais tratados com ciclodextrina vazia. Valores apresentados como média  $\pm$  E.P.M A. Alamandina: HP $\beta$ CD  $0,022 \pm 0,027$ ; Ala50 $\mu$ g  $0,041 \pm 0,053$ pg.mg $^{-1}$ . B. ang-(1-7): HP $\beta$ CD  $0,003 \pm 0,004$ ; Ala50 $\mu$ g  $0,002 \pm 0,002$ pg.mg $^{-1}$ . C. angII: HP $\beta$ CD  $0,131 \pm 0,112$ ; Ala50 $\mu$ g  $0,126 \pm 0,0643$ pg.mg $^{-1}$ . D. angI: HP $\beta$ CD  $0,127 \pm 0,056$ ; Ala50 $\mu$ g  $0,100 \pm 0,0416$ pg.mg $^{-1}$ . (n=5-7 por grupo). Teste Mann-Whitney (\* P < 0,05).





**Figura 16:** Quantificação de peptídeos do SRA em tecido tumoral de animais tratados com alamandina incluída em ciclodextrina (50μg/Kg/dia) comparados com animais tratados com ciclodextrina vazia. Valores apresentados como média ± E.P.M A. Alamandina: HPβCD 38,63±9,37pg/ml; Ala50μg 48,99±10,94pg/ml. B. ang-(1-7): HPβCD 7,656±1,586; Ala 50μg 6,218±1,147. C. angII: HPβCD 0,05421±0,02520pg/ml; Ala 50μg 0,02202±0,01689. D. angI: HPβCD 0,1975±0,3537pg/ml; Ala50μg 1,358±0,8220. (n=5-6 por grupo). Teste Mann-Whitney (\* P <0,05).



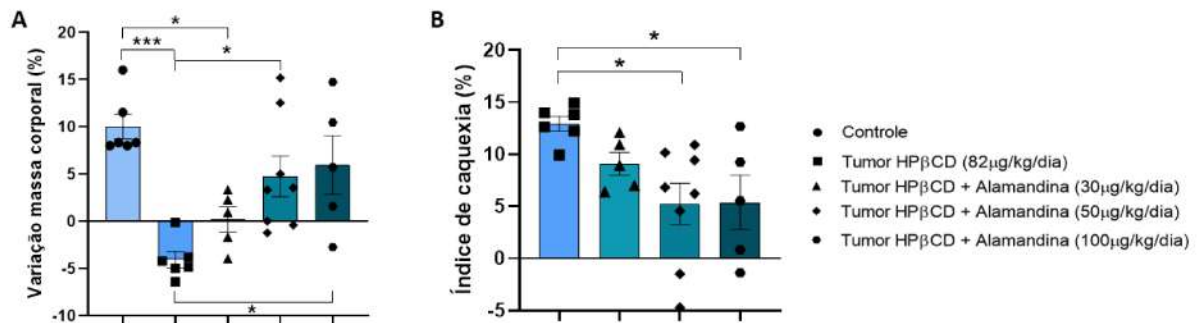
**Figura 17:** Regressão linear modelando a relação entre a concentração tumoral de angII e o volume tumoral final em animais tratados com alamandina incluída em ciclodextrina (50µg/Kg/dia) comparados com animais tratados com ciclodextrina vazia. Coeficiente de correlação de Pearson indicando relação linear inversa com  $P < 0,05$ ).

### **5.5 Efeito da administração oral de Alamandina na caquexia relacionada ao câncer**

A caquexia continua sendo uma grande complicação e fator de agravamento do prognóstico em pacientes em tratamento de neoplasias. Aqui, avaliamos alguns parâmetros relativos a essa condição, tendo em vista que o implante de tumor singênico com células B16F10 é um modelo animal já padronizado de caquexia. (Voltarelli et al. 2017) Subtraindo-se a massa tumoral da massa corporal final, e calculando-se a variação de massa corporal (em porcentagem) a partir da massa inicial dos animais, foi possível notar que o tumor levou à intensa perda de massa e a alamandina, nas doses de 50 e 100µg (Figura 18.A), foi capaz de preservar a massa corporal dos animais testados, sem diferença significativa de animais saudáveis não portadores de tumor (CT 10,03±3,222%; HPβCD -4,073±2,127%; Ala30µg 0,1880±2,980%; Ala50µg 4,744±6,063%; Ala100µg 5,946±6,934%). O índice de caquexia foi calculado pela comparação de parâmetros dos animais não portadores de tumor (CT), cujo ganho de peso chegou a 10% da massa inicial (Figura 18.B). Assim, constatou-se que o grupo HPβCD chegou a um índice de caquexia acima de 10% e que os grupos Ala50 e 100µg, foram estatisticamente diferentes dos animais portadores de tumor não tratados com alamandina. Considerando-se o consenso de que índices acima de 5% caracterizam um estado

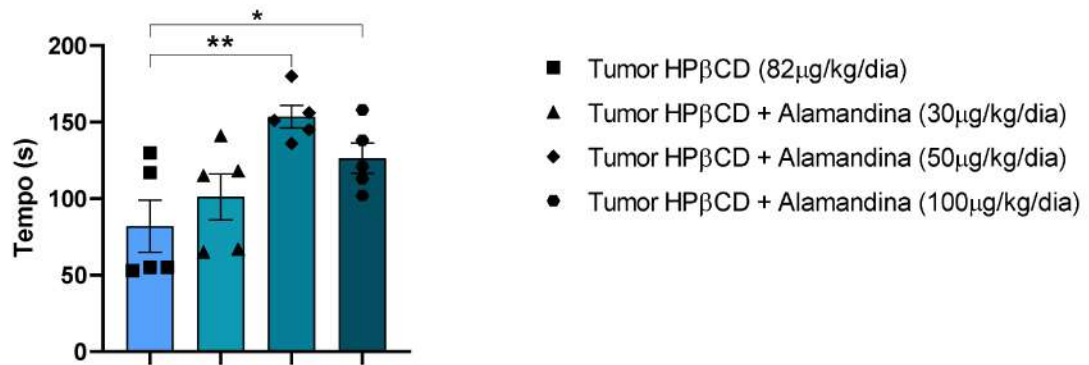


de caquexia, (K. Fearon et al. 2011) pode-se inferir que nas doses de 50 e 100 $\mu$ g, a alamandina foi capaz de reverter a caquexia em animais portadores de tumor sólido induzido pela implantação de células B16F10.



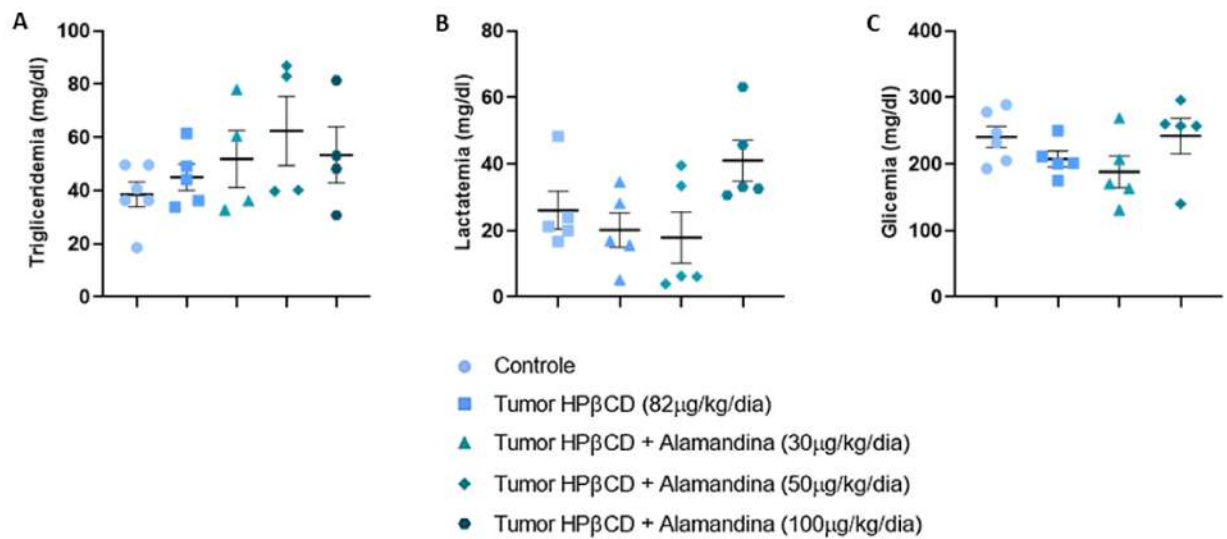
**Figura 18:** Inibição da perda de massa corporal induzida pela alamandina em animais portadores de tumor. A. Variação de massa corporal em porcentagem (em relação à massa inicial). B – Índice de caquexia considerando-se estado caquético com índice acima de 5%. Os dados são apresentados como a média  $\pm$  E.P.M (n=5-8 por grupo). One-way ANOVA seguido do teste de comparação múltipla de Tukey (\* P <0,05; \*\*\* P <0,005).

Ao final do período de tratamento e previamente à eutanásia, os animais foram adaptados a uma sala para realização do teste de força invertido. (Deacon et al. 2013) Animais saudáveis foram submetidos ao teste para estabelecimento do tempo máximo de teste e foram feitas três tentativas por animal. Assumindo-se 200 segundos como limite para o teste, é possível notar que o grupo HP $\beta$ CD (82,0 $\pm$ 38,2s) apresentou pior desempenho e o grupo tratado com alamandina nas concentrações de 50 (154 $\pm$ 16,5s) e 100 $\mu$ g (126 $\pm$ 22,0s) foram significativamente diferentes do grupo HP $\beta$ CD (Figura 19). Esse resultado corrobora a redução do índice de caquexia mensurada para essas duas concentrações administradas do peptídeo.



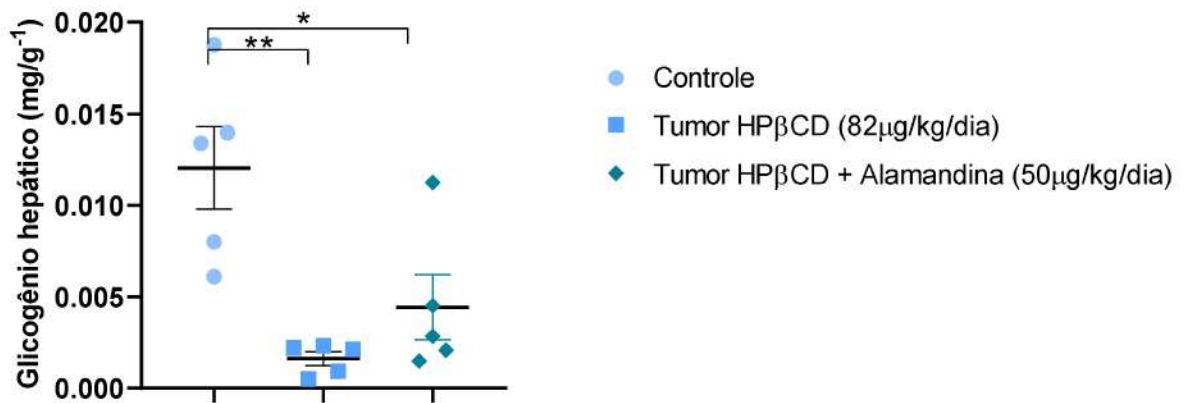
**Figura 19:** Desempenho (em segundos) de animais portadores de tumor tratados com alamandina incluída em ciclodextrina (20, 50 e 100μg/Kg/dia) comparados com animais tratados com ciclodextrina vazia. Os dados são apresentados como a média ± E.P.M (n=5 por grupo). One-way ANOVA seguido do teste de comparação múltipla de Tukey (\* P <0,05; \*\* P <0,01; \*\*\* P <0,005; \*\*\*\* P <0,001).

Diversas alterações metabólicas são observadas na caquexia, podendo ocorrer aumento plasmático dos níveis de ácidos graxos livres, hipercolesterolemia e hiperlactatemia, em virtude da alta demanda energética do tecido tumoral em crescimento. A glicemia pode se manter inalterada, entretanto, pode ser observado depleção das reservas energéticas hepáticas pelo aumento da taxa de glicogenólise no órgão. (Jurdana 2009; K. C. H. Fearon, Glass, e Guttridge 2012; Bruggeman et al. 2016).



**Figura 20:** Parâmetros metabólicos de animais alimentados. A. Triglicerídeos plasmáticos. B. Lactato plasmático. C. Glicose plasmática. (n=5-6 por grupo). Dados apresentados como média ± E.P.M One-way ANOVA seguido do teste de comparação múltipla de Tukey.

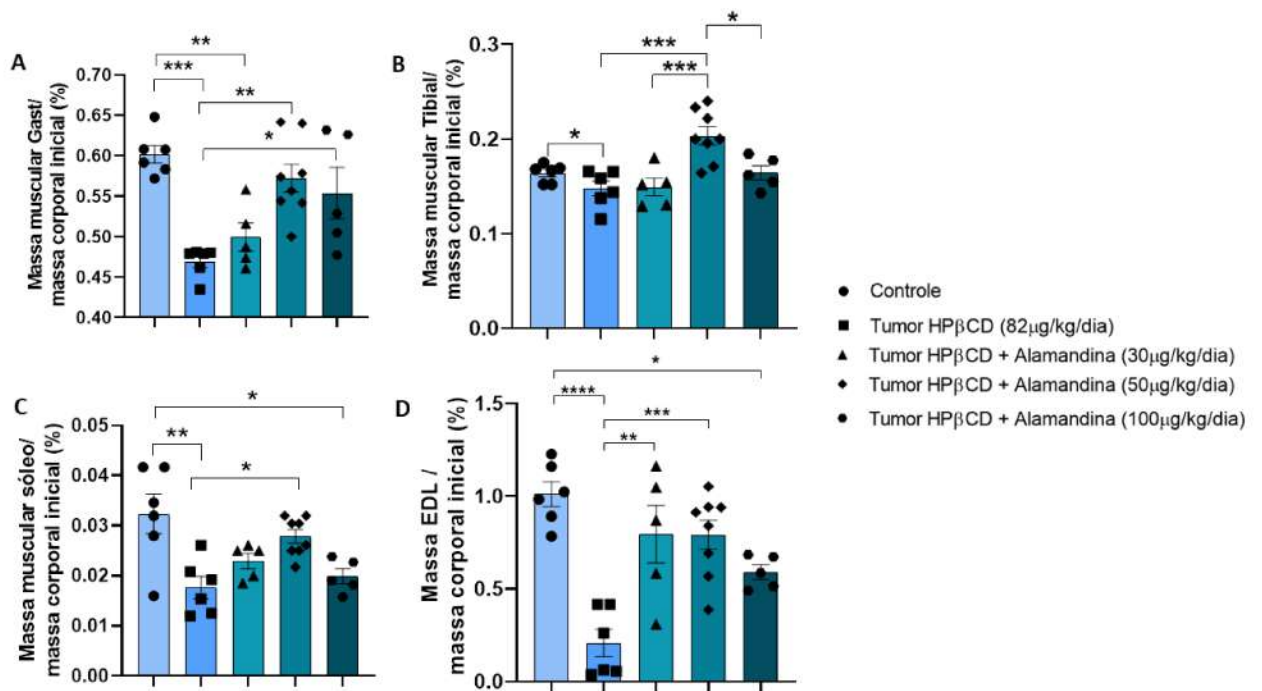
Os níveis plasmáticos de triglicerídeos, lactato e glicose foram quantificados, não sendo observada nenhuma alteração significativa entre os grupos (Figura 20). Quanto ao glicogênio hepático (Figura 21), no grupo de animais portadores de tumor tratados apenas com ciclodextrina vazia houve uma intensa depleção da reserva de glicogênio (HPβCD  $0,001617 \pm 0,0008355 \text{ mg.g}^{-1}$ ) quando comparado com animais saudáveis (CT  $0,01205 \pm 0,005060 \text{ mg.g}^{-1}$ ). Nos animais que foram tratados com alamandina na concentração de  $50 \mu\text{g}$ , foi observado leve preservação do glicogênio hepático (Ala  $50 \mu\text{g}$   $0,004432 \pm 0,003976 \text{ mg.g}^{-1}$ ), mas não diferente dos animais não tratados.



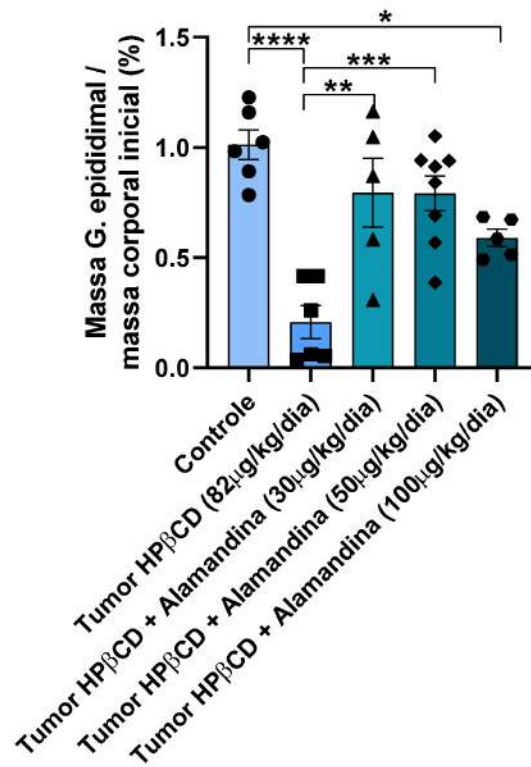
**Figura 21:** Reserva hepática de glicogênio em animais alimentados. Representação gráfica da média  $\pm$  E.P.M. da quantidade de glicogênio hepático em mg por g de tecido. (n=5 por grupo). One-way ANOVA seguido do teste de comparação múltipla de Tukey (\* P <0,05; \*\* P <0,01).

Os efeitos mais devastadores da caquexia estão relacionados ao intenso processo de depleção de todas as reservas de energia corporais. Observa-se aumento do catabolismo proteico muscular e inibição da síntese de proteínas, aumento de lipólise no tecido adiposo e mobilização de ácidos graxos para produção de energia. (Bruggeman et al. 2016; K. C. H. Fearon, Glass, e Guttridge 2012). Neste modelo experimental de caquexia induzida por células B16F10 foi observada intensa perda de massa muscular e adiposa nos animais do grupo tratado apenas com ciclodextrina vazia, ao passo que a alamandina foi capaz de preservar o tecido muscular, principalmente na dose de 50μg/Kg/dia (Figura 22). Efeito semelhante foi observado pela quase completa depleção do tecido adiposo epididimal e preservação do mesmo pela alamandina (Figura 23).



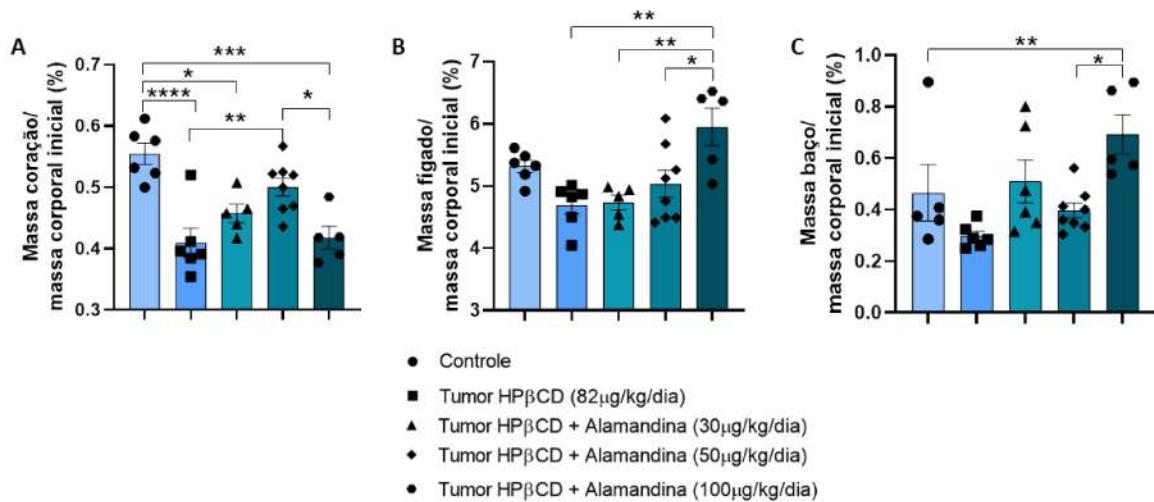


**Figura 22.** Inibição da perda muscular induzida pela alamandina em animais portadores de tumor. Representação gráfica da média  $\pm$  E.P.M da massa muscular (em porcentagem) comparado à massa corporal inicial, dos músculos: A. Gastrocnêmio. B. Tibial anterior. C. Sóleo. D. EDL. (n=5-8 por grupo). One-way ANOVA seguido do teste de comparação múltipla de Tukey (\* P < 0,05; \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,005; \*\*\*\* P < 0,001).



**Figura 23:** Inibição da perda de tecido adiposo induzida pela alamandina em animais portadores de tumor. Representação gráfica da média  $\pm$  E.P.M da massa da gordura epididimal (em porcentagem) comparado à massa corporal inicial. (n=5-8 por grupo). One-way ANOVA seguido do teste de comparação múltipla de Tukey (\* P <0,05; \*\* P <0,01; \*\*\* P <0,005; \*\*\*\* P <0,001).

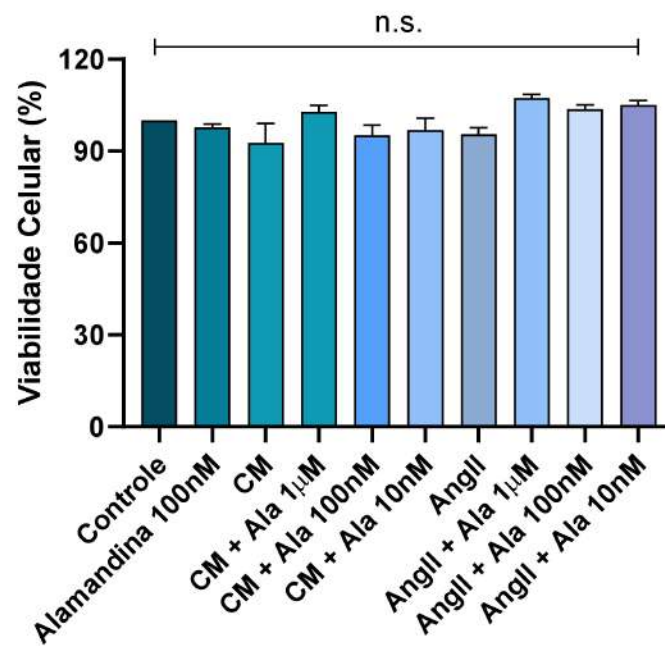
Não foram observadas alterações significativas nas massas hepáticas e esplênicas, exceto pelo grupo tratado com Ala100 $\mu$ g, que apresentou aumento da massa desses órgãos (Figura 24). No grupo portador de tumor tratado com ciclodextrina vazia ( $0,410 \pm 0,0573\%$ ) houve uma perda de mais de 20% da massa cardíaca em relação ao controle saudável ( $0,554 \pm 0,0426\%$ ), o que corrobora dados da literatura. (Belloum, Rannou-Bekono, e Favier 2017). Por outro lado, nos animais tratados com alamandina houve reversão parcial dessa perda nos grupos 30 $\mu$ g ( $0,458 \pm 0,0336\%$ ) e 100 $\mu$ g ( $0,418 \pm 0,0412\%$ ) e inibição da caquexia cardíaca no grupo tratado com 50 $\mu$ g de alamandina ( $0,501 \pm 0,0417\%$ ) (Figura 24).



**Figura 24:** Efeito da alamandina em órgãos de animais portadores de tumor. Representação gráfica da média  $\pm$  E.P.M da massa (em porcentagem) comparado à massa corporal inicial, dos órgãos: A. Coração. B. Fígado. C. Baço. (n=5-8 por grupo). One-way ANOVA seguido do teste de comparação múltipla de Tukey (\* P <0,05; \*\* P <0,01; \*\*\* P <0,005; \*\*\*\* P <0,001).

### 5.6 Efeito da alamandina na viabilidade de miotubos murinos

Parte do efeito atrófico induzido pelas citocinas tumorais no músculo esquelético é atribuído a apoptose de células musculares (Tisdale 2009). Para testar o efeito de citocinas inflamatórias tumorais e do peptídeo angiotensina II em miotubos, foi realizado um ensaio de viabilidade pelo método MTT (como descrito no item 3.2) em linhagem de músculo esquelético murino, C2C12. Não foi observada nenhuma diferença estatística na viabilidade de células C2C12 diferenciadas, e expostas aos compostos angiotensina II, meio condicionado por células tumorais B16F10 e alamandina (Figura 25).



**Figura 25:** Viabilidade de células C2C12 expostas a CM, angII e Alamandina por 72h. Densidades ópticas obtidas pelo método de MTT de três experimentos em quadruplicata, apresentadas como média  $\pm$  E.P.M. One-way ANOVA seguido do teste de comparação múltipla de Dunnet (n.s. – não significativo). meio condicionado (CM), angiotensina II (angII), alamandina (ala).



## 6 **DISCUSSÃO**

O câncer continua sendo a segunda principal causa de morte no mundo, perdendo apenas para as doenças cardiovasculares (Naghavi et al. 2017). É particularmente mais comum em países mais desenvolvidos, onde as doenças infectocontagiosas são menos abundantes e existe uma maior expectativa de vida média (Naghavi et al. 2017). Entretanto, no Brasil existe uma propensão acentuada para as neoplasias de pele, pela localização geográfica e hábitos da população (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2019). Nesse contexto, no país, as malignidades de pele são as mais abundantes considerando-se ambos os sexos, correspondendo a mais de 30% das ocorrências (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2019). Dentre os tipos de câncer de pele, o melanoma é o menos comum, no entanto, está associado a mais de 70% das mortes por câncer de pele mundialmente (Rebecca, Somasundaram, e Herlyn 2020). Um dos grandes desafios no enfrentamento dessa doença é a alta capacidade de metástase, principalmente para o cérebro, com incidência estimada em 60% dos casos (Rebecca, Somasundaram, e Herlyn 2020). Além das complicações locais do tecido tumoral, as neoplasias apresentam acometimentos paraneoplásicos graves como a caquexia associada ao câncer. A caquexia neoplásica é uma complicação comum, acometendo até metade dos pacientes com câncer em estado avançado e relacionada à cerca de 22% dos óbitos nesse grupo de indivíduos (Aoyagi et al. 2015). Desse modo, o melanoma e a caquexia associada ao câncer são preocupações mundiais e vários grupos de pesquisa se dedicam à investigação nessas duas áreas. Nesse estudo utilizamos o modelo singênico com células da linhagem B16F10 e camundongos C57BL/6J, um método acessível para formação de tumor sólido que simula a dificuldade de tratamento do melanoma (Overwijk e Restifo 2001) e também promove um estado de caquexia importante para estudo e investigação (Voltarelli et al. 2017).

Inicialmente, para caracterizar a atividade da alamandina em células de melanoma murino B16F10, a viabilidade dessa linhagem celular foi avaliada frente à exposição de diferentes concentrações do peptídeo alamandina. O método utilizado foi da mensuração indireta de viabilidade celular pela atividade enzimática celular pós exposição ao cristal de tetrazólio, MTT (Mosmann 1983). Comparando os grupos experimentais com células não tratadas (controle), foi possível observar redução significativa da viabilidade celular nas concentrações de 1, 10 e 100 $\mu$ M. Em

trabalhos prévios do nosso grupo, não foi possível mensurar a atividade da alamandina em células tumorais; além disso, ainda não existem referências da concentração do peptídeo como agente antiproliferativo. Podemos correlacionar esse resultado com trabalhos anteriores referentes à atividade do peptídeo ang-(1-7) e linhagens tumorais *in vitro*. Já foi demonstrado que na concentração de 100nM, a ang-(1-7) é capaz de inibir significativamente o crescimento (Gallagher 2004) e migração de células de adenocarcinoma pulmonar A549 (Wan 2011), mesmo efeito observado em linhagem de tumor prostático PC3 (Krishnan, Torti, et al. 2013; Krishnan, Smith, et al. 2013). Resultado semelhante foi obtido no ensaio de formação de colônias *in vitro*. O experimento foi originalmente proposto por Puck e Marcus na década de 60 (Puck e Marcus 1956) para mensurar a dose de radiação capaz de inibir a capacidade de células HeLa na formação de novos clones. Atualmente o método é utilizado para prever o quanto determinado tratamento físico ou químico é capaz de inibir a formação de novos clones e colônias celulares *in vitro*. Na mesma concentração encontrada para inibição da viabilidade, 1 $\mu$ M de alamandina, foi observada redução significativa da formação de novos clones de células B16F10. Foi detectada aparente redução na concentração de 100nM, mas sem diferença estatística em relação ao controle (células não tratadas). Resultados semelhantes foram reportados na literatura para angiotensin-(1-7) na concentração de 1nM em células de tumor prostático LNCap e DU-145, mas sem resultados significativos para linhagem PC3 (Domińska et al. 2018). Também foi demonstrada a redução na formação de colônias em células derivadas de carcinoma escamoso nasofaríngeo humano (CNE-1e CNE-2), modificadas para super-expressar ang-(1-7) (Pei et al. 2016). As diferenças de resultados comparando-se as concentrações dos peptídeos pode estar relacionada a um menor tempo de meia-vida ( $T_{1/2}$ ) da alamandina em relação à ang-(1-7), mas são necessários experimentos para comprovar essa hipótese.

Uma das dificuldades em relação ao estudo de compostos peptídicos, e extrapolação de resultados *in vitro* para modelos *in vivo*, é a pequena meia-vida desses peptídeos. Sabe-se que o  $T_{1/2}$  da ang-(1-7) na circulação de ratos e cachorros está entre 20-30 min, quando administrada na dose de 10 mg/kg/dia (Mordwinkin et al. 2012). Esse pequeno tempo de metabolização compromete o potencial desses peptídeos como agentes a serem utilizados em estudo com modelos animais e pesquisas clínicas. Para isso, alguns mecanismos são utilizados

para proteção do peptídeo, aumento do  $T_{1/2}$  e, conseqüentemente, biodisponibilidade do mesmo. Em nosso grupo já foi demonstrado o aumento da meia-vida da ang-(1-7) em ratos quando protegida por inclusão em hidroxipropil-betaciclodextrina (ciclodextrina). Foi observado um aumento substancial na concentração plasmática do peptídeo após seis horas da administração oral em composto de inclusão com ciclodextrina. O efeito cardioprotetor observado em modelo de infarto e hipertrofia induzida por isoproterenol, foi ausente na administração do peptídeo livre (Marques et al. 2011). A inclusão de alamandina em ciclodextrina (30  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$ ) também foi eficaz em proteger o peptídeo, permitindo seu efeito cardio e vasoprotetor em modelo de coarctação de aorta em camundongos (de Souza-Neto et al. 2019; Silva et al. 2021). Em um modelo de asma alérgica em camundongos, a administração de alamandina (50  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$ ) em ciclodextrina foi capaz de reduzir o processo inflamatório pulmonar (Gregório et al. 2018). Assim, para estudo do efeito antitumoral da alamandina, utilizamos um modelo singênico heterotópico de melanoma murino em camundongos C57B/6J tratados oralmente com alamandina protegida em ciclodextrina, com concentrações baseadas nos resultados acima citados.

Para efeito comparativo foram propostos cinco grupos: controle não tumoral (camundongos C57BL/6J saudáveis); controle tumoral (camundongos C57BL/6J com inoculação de células B16F10 tratados diariamente com ciclodextrina vazia (HP $\beta$ CD 82 $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{dia}$ ); e camundongos C57BL/6J com inoculação tumoral tratados diariamente com alamandina nas doses de 30 $\mu\text{g}$  (30 $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{dia}$ ), 50 $\mu\text{g}$  (50 $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{dia}$ ) e 100 $\mu\text{g}$  (100 $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{dia}$ ). Os animais foram acompanhados por 14 dias, sendo o peptídeo (em ciclodextrina ou ciclo vazia) administrado diariamente com dose corrigida pelo peso. Tomando o crescimento tumoral como porcentagem em relação ao tamanho inicial, foi possível observar contenção do crescimento tumoral a partir do nono dia de tratamento no grupo Ala50 $\mu\text{g}$  (HP $\beta$ CD 352,56 $\pm$ 195,35mm<sup>3</sup>; Ala50 $\mu\text{g}$  192,07 $\pm$ 97,92mm<sup>3</sup>). Após o décimo primeiro dia, todos os animais tratados com alamandina apresentaram redução significativa do volume tumoral quando comparado ao grupo HP $\beta$ CD (ciclodextrina vazia) (HP $\beta$ CD 585,27 $\pm$ 261,37mm<sup>3</sup>; Ala30 $\mu\text{g}$  395,16 $\pm$ 206,67mm<sup>3</sup>; Ala50 $\mu\text{g}$  297,03 $\pm$ 122,87mm<sup>3</sup>; Ala100 $\mu\text{g}$  596,27 $\pm$ 396,88mm<sup>3</sup>). Ao final dos 14 dias, quando comparados os valores brutos de volume tumoral foi possível notar redução expressiva no grupo Ala50 $\mu\text{g}$  e uma redução menos expressiva no grupo Ala30 $\mu\text{g}$  (HP $\beta$ CD 1,464 $\pm$ 0,3686cm<sup>3</sup>;

Ala30 $\mu$ g/Kg/dia 1,245 $\pm$ 0,4211 cm<sup>3</sup>; Ala50 $\mu$ g/Kg/dia 0,5462 $\pm$ 0,2929 cm<sup>3</sup>). Resultados similares foram observados para massa tumoral final (HP $\beta$ CD 2,015 $\pm$ 0,6376g Ala30 $\mu$ g/Kg/dia 1,776 $\pm$ 0,5584g Ala50 $\mu$ g/Kg/dia 0,6730 $\pm$ 0,4722g). Curiosamente, na comparação do crescimento tumoral em porcentagem do volume inicial, a dose de 100 $\mu$ g apresenta efeito inibitório semelhante a dose de 30 $\mu$ g. Todavia, esse efeito não é notado comparando-se valores brutos de volume e massa (volume: HP $\beta$ CD 1,464 $\pm$ 0,3686cm<sup>3</sup>; Ala100 $\mu$ g/Kg/dia 1,601 $\pm$ 0,4157 cm<sup>3</sup> e massa: HP $\beta$ CD 2,015 $\pm$ 0,6376g; Ala100 $\mu$ g/Kg/dia 2,595 $\pm$ 0,2317g). Não é possível inferir se esse efeito se deve à perda de especificidade do peptídeo ao seu receptor MrgD, pois ainda não há na literatura evidências que fundamentem essa hipótese. Assim, uma melhor investigação é necessária.

Para avaliar a efetividade do tratamento, utilizamos espectrometria de massas para mensurar os níveis de alamandina após o tratamento, bem como outros peptídeos do SRA. Analisamos as amostras do controle tumoral e Ala50 $\mu$ g (dose com melhor resultado). Observamos um aumento no nível de alamandina plasmática nos animais tratados com o peptídeo em relação ao grupo que recebeu apenas ciclodextrina vazia (26%) e aumento considerável nos níveis de angI (587%). Não foi observada alteração nos níveis de angII e ang-(1-7). Aqui observamos um aumento menos expressivo se compararmos os resultados de Marques e colaboradores (2011). Entretanto, nesse trabalho foram utilizados ratos.

A relação entre o processo de tumorigênese e o sistema renina angiotensina vem sendo progressivamente explorada e descrita na literatura. O desequilíbrio do SRA induz proliferação do tecido tumoral por estímulo direto ao tumor e estroma tumoral, e indiretamente por induzir formação de novos vasos sanguíneos para suprimento tumoral (Wegman-Ostrosky et al. 2015). O gatilho para interesse no estudo do SRA e desenvolvimento do câncer aconteceu quando Lever e colaboradores (1998) demonstraram em estudo retrospectivo que pacientes hipertensos em uso de inibidores de ECA (iECA), tinham menor risco de desenvolver certos tipos de neoplasias (Lever et al. 1998; Hole et al. 1998). Mais tarde, novas pesquisas indicaram que tal efeito não era diretamente relacionado aos medicamentos, mas sim à inibição de componentes do SRA. A inibição da ECA levaria à diminuição da síntese de angII, já descrita como agente pró-angiogênico (Fernandez, Twickler, e Mead 1985; Le Noble et al. 1993) e pró-proliferativo (Paquet et al. 1990; Daemen et al. 1991). Múltiplas evidências têm sido publicadas sugerindo

que perturbações no equilíbrio dos componentes do SRA local contribuem para transformação maligna celular e manutenção do metabolismo tumoral (Ager, Neo, e Christophi 2008; George, Thomas, e Hannan 2010; Wegman-Ostrosky et al. 2015). A angiotensinall é o peptídeo mais estudado nesse contexto, estando seu receptor, AT1, usualmente mais expresso em diversos tipos de câncer (George, Thomas, e Hannan 2010). Ligando-se ao receptor AT1, a angII induz proliferação celular, angiogênese e inibição de mecanismos de morte celular. Efeitos opostos são desencadeados através da sinalização de seu receptor AT2, incluindo efeito antiinflamatório e antiproliferativo (Dolley-Hitze et al. 2010). Sequencialmente, Menon e colaboradores (2007) postularam que além da inibição da síntese de angII pelo uso de iECA, outro fator seria responsável pela redução da incidência de câncer (Menon et al. 2007). A inibição da ECA, impedindo sua atividade sobre a angiotensinal, aumentaria a disponibilidade desse substrato para produção de angiotensina-(1-7) pela ação da ECA2, NEP, PEP ou TOP (Kohara, Brosnihan, e Ferrario 1993; Luque et al. 1996). Já existia evidências do efeito antiproliferativo da ang-(1-7) em células de músculo liso vascular pós-injúria (Freeman et al. 1996; Strawn, Ferrario, e Tallant 1999) e trabalhos posteriores corroboraram tal efeito em linhagens celulares tumorais (Tallant, Ferrario, e Gallagher 2005; Menon et al. 2007). Considerando a importância do equilíbrio desses peptídeos do SRA para fisiopatologia do câncer, também mensuramos abundância dos mesmos no tecido tumoral através de espectrometria de massas. Diferença significativa foi encontrada apenas para angII, que diminui cerca de 50%. Embora não houve aparente alteração da alamandina ou ang-(1-7) no tecido tumoral, a redução de angII é indicativo de inibição da proliferação, visto que esse peptídeo é relacionado à sobrevivência celular e progressão tumoral (Fernandez, Twickler, e Mead 1985; Paquet et al. 1990; Daemen et al. 1991).

Outro aspecto avaliado foi o estado de caquexia no modelo animal utilizado. Existem vários modelos animais para mimetizar os efeitos da caquexia relacionada ao câncer, tamanha a importância de buscar alternativas para melhorar a qualidade e expectativa de vida de pacientes em estados avançados da doença. Em geral os modelos baseiam-se nos inóculos de células tumorais, para indução da atrofia muscular e disfunção metabólica características da caquexia. Dentre os modelos murinos mais utilizados estão a inoculação de células de carcinoma mamário 4T1, carcinoma de cólon CT26, linfoma EL4 T, linfoma LLC e melanoma B16F10. O

modelo B16F10 foi escolhido por ser um tipo de neoplasia de tratamento desafiador, facilmente reprodutível e capacidade de induzir caquexia em tempo curto, evitando sofrimento prolongado das cobaias. Durante o manejo dos animais no piloto para padronização do método de indução tumoral, foi possível notar a diferença de mobilidade e força muscular entre os grupos controle tumoral e animais tratados com alamandina. De fato, já é sabido que o modelo de tumor com células B16F10 é capaz de gerar um estado considerável de caquexia, com perda de massa muscular, tecido adiposo e redução de força global (Overwijk e Restifo 2001, 16; Voltarelli et al. 2017). Assim, o mesmo modelo experimental foi utilizado para avaliar o estado de caquexia e os efeitos do tratamento com alamandina nestes grupos de animais.

O índice de caquexia foi calculado segundo Marques e colaboradores (2016), comparando-se a alteração de massa corporal e massa tumoral final dos animais portadores de tumor, em relação ao ganho de massa corporal de animais saudáveis (sem indução tumoral) (Martins et al. 2016). Em média os animais saudáveis aumentaram em 10% a massa corporal após os 14 dias do procedimento. Os animais portadores de tumor tratados com ciclodextrina vazia tiveram uma perda estimada em 4% de massa corporal. Em contrapartida, nos animais tratados com alamandina 30 $\mu$ g não foi observada variação da massa corporal, houve ganho de massa nos grupos Ala50 $\mu$ g e 100 $\mu$ g de 4,7 e 5,9%, respectivamente. O índice de caquexia para o grupo HP $\beta$ CD chegou à média de 12% e a alamandina foi capaz de reduzir significativamente a porcentagem de caquexia indicando preservação da massa corporal. Surpreendentemente, mesmo com massa e volume tumoral final comparável com o grupo tratado com ciclodextrina vazia, os animais Ala100 $\mu$ g mostraram preservação da massa livre do tumor e redução do índice de caquexia. Esse fato poderia ser explicado pela ação direta da alamandina na preservação do tecido muscular, mesmo na presença do câncer. Já foi demonstrado que a ang-(1-7) é capaz de preservar o tecido muscular esquelético, muscular cardíaco e tecido adiposo em camundongos com modelo de caquexia neoplásica, indicando potencial efeito anticaquético do peptídeo (Rupert, Koniaris, e Zimmers 2019; Murphy et al. 2019).

O efeito catabólico da caquexia pode levar à perda de força muscular incapacitante, reduzindo a qualidade de vida e complicando a resposta do paciente aos tratamentos. A função muscular dos animais foi testada previamente à eutanásia pelo método de Kondziela (Deacon 2013). Corroborando a redução do índice de

caquexia apresentado nos grupos Ala50µg e 100µg, o tempo de latência para queda foi aumentado, quando comparado com animais que não receberam alamandina. Outro indício do efeito da alamandina na regulação do processo caquético foi a preservação dos músculos gastrocnêmio, sóleo, tibial e extensor longo dos dedos. Em contrapartida, no grupo HPβCD houve intensa perda de massa muscular, comparado com animais saudáveis. Efeito semelhante foi observado para o tecido muscular cardíaco e gordura epididimal, mesmo no grupo Ala100µg, indicando o potencial efeito protetivo na caquexia relacionada ao câncer.

A síndrome paraneoplásica também se caracteriza por importantes alterações metabólicas para manutenção da progressão tumoral. Cerca de 50% dos indivíduos diagnosticados com caquexia relacionada ao câncer apresenta hipermetabolismo com aumento acima de 110% do gasto energético basal ou de repouso (K. C. H. Fearon, Glass, e Guttridge 2012; Petruzzelli e Wagner 2016). As causas desse processo hipermetabólico ainda são desconhecidas, mas estima-se que esteja relacionada à inflamação sistêmica e disfunções geradas pela cascata de citocinas pró-inflamatórias (Falconer et al. 1994). Uma alteração importante é a intensa gliconeogênese e glicogenólise para suprimento energético das células tumorais. Os processos simultâneos de síntese de glicose e consumo rápido, geralmente, mantêm a glicemia inalterada (Edén et al. 1984). Esse exacerbado consumo energético no estado basal é em parte ocasionado pelo aumento do metabolismo da glicose (ciclos fúteis) e ressíntese de glicose a partir do lactato (ciclo de Cori), mesmo em condições aeróbicas. Estima-se que 40% do elevado dispêndio de energia no estado de repouso seja consequência desse atípico fluxo de glicose (Lundholm et al. 1982). Apesar do intenso catabolismo proteico e mobilização de ácidos graxos das reservas adiposas característicos da caquexia, a gliconeogênese a partir da alanina ou glicerol, parece não ter efeito importante para o gasto de energia no repouso (Edén et al. 1984). Nesse modelo não observamos diferença estatística para os níveis plasmáticos de triglicerídeos, lactato e glicose. Entretanto, o tumor induziu intensa depleção das reservas de glicogênio no fígado e tal efeito foi parcialmente revertido pela administração de alamandina (Ala50µg). Nesse caso não é possível inferir se o peptídeo tem ação direta no metabolismo, ou se o resultado foi consequência da redução do tamanho tumoral.

Por fim, foi avaliado o efeito da alamandina diretamente em células musculares isoladas submetidas a um modelo de atrofia muscular *in vitro*. Parte do efeito de

perda muscular relacionado à caquexia é devido a apoptose de células no músculo esquelético (Tisdale 2009). Para simular o efeito da caquexia, miotubos murinos diferenciados foram submetidos a dois fatores pró-atrofia: meio condicionado por células tumorais B16F10 (Leal et al. 2021) e angII (Yoshida et al. 2013). Não foi observada nenhuma alteração na viabilidade de células C2C12 na presença de alamandina ou desses fatores pró-atrofia.

Em conjunto, os resultados observados neste trabalho indicam o potencial terapêutico da alamandina na caquexia relacionada ao câncer. Em relação ao efeito antitumoral, o peptídeo não apresentou comportamento semelhante aos quimioterápicos clássicos. Assim, é necessária a investigação da interação da alamandina com outros receptores do sistema renina angiotensina, possibilitando no futuro a utilização de um agonista sintético do receptor MrgD. Isso seria também uma solução para a pequena meia-vida do heptapeptídeo. Mais experimentos serão realizados para explorar a atividade da alamandina diretamente sobre o tecido muscular e investigação das vias metabólicas relacionadas a tal efeito.



## **7 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS**

Nossos dados sugerem que a alamandina reduz a abundância de angII tumoral, o que pode explicar seu efeito antitumoral e anticaquético. Nesse contexto, ainda é necessário mensurar marcadores inflamatórios desencadeados pela ativação do eixo angII/AT1, IL-6, TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$ , relacionados tanto à progressão do tumor quanto catabolismo proteico muscular e atividade lipolítica nas reservas corporais. Além disso, é preciso confirmar se existe atuação direta da alamandina no tecido muscular, com efeito mioprotetor, ou se o efeito observado foi uma consequência da redução tumoral.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Afsar, B., R. E. Afsar, L. A. Ertuglu, M. Kuwabara, A. Ortiz, A. Covic, e M. Kanbay. 2021. "Renin-Angiotensin System and Cancer: Epidemiology, Cell Signaling, Genetics and Epigenetics". *Clinical & Translational Oncology: Official Publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico* 23 (4): 682–96. <https://doi.org/10.1007/s12094-020-02488-3>.
- Ager, Eleanor I., Jaclyn Neo, e Christopher Christophi. 2008. "The Renin-Angiotensin System and Malignancy". *Carcinogenesis* 29 (9): 1675–84. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgn171>.
- Aoyagi, Tomoyoshi, Krista P. Terracina, Ali Raza, Hisahiro Matsubara, e Kazuaki Takabe. 2015. "Cancer Cachexia, Mechanism and Treatment". *World Journal of Gastrointestinal Oncology* 7 (4): 17–29. <https://doi.org/10.4251/wjgo.v7.i4.17>.
- Aoyagi, Tomoyoshi, Krista P Terracina, Ali Raza, Hisahiro Matsubara, e Kazuaki Takabe. [s.d.]. "Cancer Cachexia, Mechanism and Treatment" 7 (4): 14.
- Baracos, Vickie E. 2006. "Cancer-Associated Cachexia and Underlying Biological Mechanisms". *Annual Review of Nutrition* 26 (1): 435–61. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.26.061505.111151>.
- Belloum, Yassine, Françoise Rannou-Bekono, e François B. Favier. 2017. "Cancer-Induced Cardiac Cachexia: Pathogenesis and Impact of Physical Activity (Review)". *Oncology Reports* 37 (5): 2543–52. <https://doi.org/10.3892/or.2017.5542>.
- Bradford, Marion M. 1976. "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding". *Analytical Biochemistry* 72 (1): 248–54. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- Bruggeman, Andrew R, Arif H Kamal, Thomas W LeBlanc, Joseph D Ma, Vickie E Baracos, e Eric J Roeland. 2016. "Cancer Cachexia: Beyond Weight Loss" 12 (11): 10.
- Cambados, Nadia, Thomas Walther, Karen Nahmod, Johanna M. Tocci, Natalia Rubinstein, Ilka Böhme, Marina Simian, et al. 2017. "Angiotensin-(1-7) Counteracts the Transforming Effects Triggered by Angiotensin II in Breast Cancer Cells". *Oncotarget* 8 (51). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.19290>.
- Carroll, Nicholas V., Robert W. Longley, e Joseph H. Roe. 1956. "THE DETERMINATION OF GLYCOGEN IN LIVER AND MUSCLE BY USE OF ANTHRONE REAGENT". *Journal of Biological Chemistry* 220 (2): 583–93. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)65284-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)65284-6).
- Cook, K. L., L. J. Metheny-Barlow, E. A. Tallant, e P. E. Gallagher. 2010. "Angiotensin-(1-7) Reduces Fibrosis in Orthotopic Breast Tumors". *Cancer Research* 70 (21): 8319–28. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-1136>.
- Coutinho, Danielle C. O., Giselle Foureaux, Keyla D. L. Rodrigues, Rodrigo L. A. Salles, Patrícia L. Moraes, Tatiane M. Murça, Marilda L. A. De Maria, et al. 2014. "Cardiovascular Effects of Angiotensin A: A Novel Peptide of the Renin-Angiotensin System". *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System: JRAAS* 15 (4): 480–86. <https://doi.org/10.1177/1470320312474856>.
- Daemen, M. J., D. M. Lombardi, F. T. Bosman, e S. M. Schwartz. 1991. "Angiotensin II Induces Smooth Muscle Cell Proliferation in the Normal and Injured Rat Arterial Wall". *Circulation Research* 68 (2): 450–56. <https://doi.org/10.1161/01.res.68.2.450>.
- Deacon, Robert M.J. 2013. "Measuring the Strength of Mice". *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, nº 76 (junho). <https://doi.org/10.3791/2610>.
- Deshayes, Frédérique, e Clara Nahmias. 2005. "Angiotensin Receptors: A New Role in Cancer?" *Trends in Endocrinology & Metabolism* 16 (7): 293–99. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2005.07.009>.

- Dolley-Hitze, T, F Jouan, B Martin, S Mottier, J Edeline, O Moranne, P Le Pogamp, et al. 2010. "Angiotensin-2 receptors (AT1-R and AT2-R), new prognostic factors for renal clear-cell carcinoma?" *British Journal of Cancer* 103 (11): 1698–1705. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605866>.
- Domińska, Kamila, Piotr Okła, Karolina Kowalska, Dominika Ewa Habrowska-Górczyńska, Kinga Anna Urbanek, Tomasz Ochędalski, e Agnieszka Wanda Piastowska-Ciesielska. 2018. "Angiotensin 1–7 Modulates Molecular and Cellular Processes Central to the Pathogenesis of Prostate Cancer". *Scientific Reports* 8 (1): 15772. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34049-8>.
- Donoghue, M., F. Hsieh, E. Baronas, K. Godbout, M. Gosselin, N. Stagliano, M. Donovan, et al. 2000. "A Novel Angiotensin-Converting Enzyme-Related Carboxypeptidase (ACE2) Converts Angiotensin I to Angiotensin 1-9". *Circulation Research* 87 (5): E1-9. <https://doi.org/10.1161/01.res.87.5.e1>.
- Edén, Elisabeth, Staffan Edström, Klas Bennegård, Tore Scherstén, e Kent Lundholm. 1984. "Glucose Flux in Relation to Energy Expenditure in Malnourished Patients with and without Cancer during Periods of Fasting and Feeding". *Cancer Research* 44 (4): 1718–24.
- Falconer, J S, K C Fearon, C E Plester, J A Ross, e D C Carter. 1994. "Cytokines, the acute-phase response, and resting energy expenditure in cachectic patients with pancreatic cancer." *Annals of Surgery* 219 (4): 325–31.
- Fearon, Kenneth, Florian Strasser, Stefan D. Anker, Ingvar Bosaeus, Eduardo Bruera, Robin L. Fainsinger, Aminah Jatoi, et al. 2011. "Definition and Classification of Cancer Cachexia: An International Consensus". *The Lancet Oncology* 12 (5): 489–95. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(10\)70218-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(10)70218-7).
- Fearon, Kenneth C. H., David J. Glass, e Denis C. Guttridge. 2012. "Cancer Cachexia: Mediators, Signaling, and Metabolic Pathways". *Cell Metabolism* 16 (2): 153–66. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.06.011>.
- Fernandez, L. A., J. Twickler, e A. Mead. 1985. "Neovascularization Produced by Angiotensin II". *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 105 (2): 141–45.
- Ferrario, C. M., M. C. Chappell, E. A. Tallant, K. B. Brosnihan, e D. I. Diz. 1997. "Counterregulatory Actions of Angiotensin-(1-7)". *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)* 30 (3 Pt 2): 535–41. <https://doi.org/10.1161/01.hyp.30.3.535>.
- Franken, Nicolaas A P, Hans M Rodermond, Jan Stap, Jaap Haveman, e Chris van Bree. 2006. "Clonogenic Assay of Cells in Vitro". *Nature Protocols* 1 (5): 2315–19. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.339>.
- Freeman, Ernest J., Guy M. Chisolm, Carlos M. Ferrario, e E. Ann Tallant. 1996. "Angiotensin-(1-7) Inhibits Vascular Smooth Muscle Cell Growth". *Hypertension* 28 (1): 104–8. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.28.1.104>.
- Gallagher, P. E. 2004. "Inhibition of Human Lung Cancer Cell Growth by Angiotensin-(1-7)". *Carcinogenesis* 25 (11): 2045–52. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgh236>.
- George, Ameer J., Walter G. Thomas, e Ross D. Hannan. 2010a. "The Renin–Angiotensin System and Cancer: Old Dog, New Tricks". *Nature Reviews Cancer* 10 (11): 745–59. <https://doi.org/10.1038/nrc2945>.
- . 2010b. "The Renin–Angiotensin System and Cancer: Old Dog, New Tricks". *Nature Reviews Cancer* 10 (11): 745–59. <https://doi.org/10.1038/nrc2945>.
- Gershenwald, Jeffrey E., Richard A. Scolyer, Kenneth R. Hess, Vernon K. Sondak, Georgina V. Long, Merrick I. Ross, Alexander J. Lazar, et al. 2017. "Melanoma Staging: Evidence-Based Changes in the American Joint Committee on Cancer Eighth Edition Cancer Staging Manual". *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 67 (6): 472–92. <https://doi.org/10.3322/caac.21409>.

- Goto, Tomoaki, Toru Nishi, Takahiko Tamura, Sukhendu B. Dev, Hideo Takeshima, Masato Kochi, Kimio Yoshizato, et al. 2000. "Highly Efficient Electro-Gene Therapy of Solid Tumor by Using an Expression Plasmid for the Herpes Simplex Virus Thymidine Kinase Gene". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97 (1): 354–59. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.1.354>.
- Gregório, Juliana, Giselle Magalhães, Glória Rodrigues-Machado, Kezia Gonzaga, Aline Oliveira, Fernando Souza-Neto, Barbara Rezende, et al. 2018. "Alamandine Reduces Eosinophilic Inflammation in an Experimental Model of Asthma". *European Respiratory Journal* 52 (suppl 62). <https://doi.org/10.1183/13993003.congress-2018.OA1648>.
- Hole, David J., Charles R. Gillis, Iain R. McCallum, Gordon T. McInnes, Pauline L. MacKinnon, Peter A. Meredith, Lilian S. Murray, James W.K. Robertson, e Anthony F. Lever. 1998. "Cancer Risk of Hypertensive Patients Taking Calcium Antagonists": *Journal of Hypertension* 16 (1): 119–24. <https://doi.org/10.1097/00004872-199816010-00017>.
- Hopkinson, Jane B., David N. M. Wright, John W. McDonald, e Jessica L. Corner. 2006. "The Prevalence of Concern About Weight Loss and Change in Eating Habits in People with Advanced Cancer". *Journal of Pain and Symptom Management* 32 (4): 322–31. <https://doi.org/10.1016/j.jpainsymman.2006.05.012>.
- Jankowski, Vera, Raymond Vanholder, Markus van der Giet, Markus Tölle, Sevil Karadogan, Johan Gobom, Jens Furkert, et al. 2007. "Mass-Spectrometric Identification of a Novel Angiotensin Peptide in Human Plasma". *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 27 (2): 297–302. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000253889.09765.5f>.
- Jenkins, Russell W., e David E. Fisher. 2021. "Treatment of Advanced Melanoma in 2020 and Beyond". *Journal of Investigative Dermatology* 141 (1): 23–31. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2020.03.943>.
- Joyce, Daniel, e Joseph J. Skitzki. 2020. "Surgical Management of Primary Cutaneous Melanoma". *Surgical Clinics of North America*, Contemporary Melanoma Management: A Surgical Perspective, 100 (1): 61–70. <https://doi.org/10.1016/j.suc.2019.09.001>.
- Jurdana, Mihaela. 2009. "Cancer Cachexia-Anorexia Syndrome and Skeletal Muscle Wasting". *Radiology and Oncology* 43 (2). <https://doi.org/10.2478/v10019-009-0007-y>.
- Kohara, K., K. B. Brosnihan, e C. M. Ferrario. 1993. "Angiotensin(1-7) in the Spontaneously Hypertensive Rat". *Peptides* 14 (5): 883–91. [https://doi.org/10.1016/0196-9781\(93\)90063-m](https://doi.org/10.1016/0196-9781(93)90063-m).
- Krishnan, Bhavani, Thomas L. Smith, Purnima Dubey, Michael E. Zapadka, Frank M. Torti, Mark C. Willingham, E. Ann Tallant, e Patricia E. Gallagher. 2013. "Angiotensin-(1-7) Attenuates Metastatic Prostate Cancer and Reduces Osteoclastogenesis". *The Prostate* 73 (1): 71–82. <https://doi.org/10.1002/pros.22542>.
- Krishnan, Bhavani, Frank M. Torti, Patricia E. Gallagher, e E. Ann Tallant. 2013. "Angiotensin-(1-7) Reduces Proliferation and Angiogenesis of Human Prostate Cancer Xenografts with a Decrease in Angiogenic Factors and an Increase in SFlt-1". *The Prostate* 73 (1): 60–70. <https://doi.org/10.1002/pros.22540>.
- Kupai, Krisztina. [s.d.]. "Gelatin Zymography for Detection of Matrix- Metalloproteinase-2 and -9 (MMP-2, MMP-9) from Myocardium Samples", 21.
- Lautner, Roberto Queiroga, Daniel C. Villela, Rodrigo A. Fraga-Silva, Neiva Silva, Thiago Verano-Braga, Fabiana Costa-Fraga, Joachim Jankowski, et al. 2013. "Discovery and Characterization of Alamandine: A Novel Component of the Renin–Angiotensin System". *Circulation Research* 112 (8): 1104–11. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.113.301077>.
- Le Noble, F. A., N. H. Schreurs, H. W. van Straaten, D. W. Slaaf, J. F. Smits, H. Rogg, e H. A. Struijker-Boudier. 1993. "Evidence for a novel angiotensin II receptor involved in angiogenesis in chick embryo

- chorioallantoic membrane". *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 264 (2): R460–65. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1993.264.2.R460>.
- Leal, Luana G., Magno A. Lopes, Sidney B. Peres, e Miguel L. Batista. 2021. "Exercise Training as Therapeutic Approach in Cancer Cachexia: A Review of Potential Anti-inflammatory Effect on Muscle Wasting". *Frontiers in Physiology* 11: 1769. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.570170>.
- Lever, Anthony F, David J Hole, Charles R Gillis, Iain R McCallum, Gordon T McInnes, Pauline L MacKinnon, Peter A Meredith, Lilian S Murray, John L Reid, e James WK Robertson. 1998. "Do Inhibitors of Angiotensin-I-Converting Enzyme Protect against Risk of Cancer?" *The Lancet* 352 (9123): 179–84. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(98\)03228-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(98)03228-0).
- Loumaye, Audrey, e Jean-Paul Thissen. 2017. "Biomarkers of Cancer Cachexia". *Clinical Biochemistry* 50 (18): 1281–88. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2017.07.011>.
- Lundholm, K., S. Edström, I. Karlberg, L. Ekman, e T. Scherstén. 1982. "Glucose Turnover, Gluconeogenesis from Glycerol, and Estimation of Net Glucose Cycling in Cancer Patients". *Cancer* 50 (6): 1142–50. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19820915\)50:6<1142::aid-cncr2820500618>3.0.co;2-i](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19820915)50:6<1142::aid-cncr2820500618>3.0.co;2-i).
- Luque, M., P. Martin, N. Martell, C. Fernandez, K. B. Brosnihan, e C. M. Ferrario. 1996. "Effects of Captopril Related to Increased Levels of Prostacyclin and Angiotensin-(1-7) in Essential Hypertension". *Journal of Hypertension* 14 (6): 799–805. <https://doi.org/10.1097/00004872-199606000-00017>.
- Marques, Fúlvia D., Anderson J. Ferreira, Rubén D.M. Sinisterra, Bruno A. Jacoby, Frederico B. Sousa, Marcelo V. Caliari, Gerluza A.B. Silva, et al. 2011. "An Oral Formulation of Angiotensin-(1-7) Produces Cardioprotective Effects in Infarcted and Isoproterenol-Treated Rats". *Hypertension* 57 (3): 477–83. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.167346>.
- Martins, Heber Amilcar, Camila Caviquioli Sehaber, Catchia Hermes-Uliana, Fernando Augusto Mariani, Flavia Alessandra Guarnier, Geraldo Emílio Vicentini, Gleison Daion Piovezana Bossolani, et al. 2016. "Supplementation with L-Glutamine Prevents Tumor Growth and Cancer-Induced Cachexia as Well as Restores Cell Proliferation of Intestinal Mucosa of Walker-256 Tumor-Bearing Rats". *Amino Acids* 48 (12): 2773–84. <https://doi.org/10.1007/s00726-016-2313-1>.
- Menon, J., D. R. Soto-Pantoja, M. F. Callahan, J. M. Cline, C. M. Ferrario, E. A. Tallant, e P. E. Gallagher. 2007. "Angiotensin-(1-7) Inhibits Growth of Human Lung Adenocarcinoma Xenografts in Nude Mice through a Reduction in Cyclooxygenase-2". *Cancer Research* 67 (6): 2809–15. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-3614>.
- Mordwinkin, Nicholas M., Jared R. Russell, Angela S. Burke, Gere S. Dizerega, Stan G. Louie, e Kathleen E. Rodgers. 2012. "Toxicological and Toxicokinetic Analysis of Angiotensin (1–7) in Two Species". *Journal of Pharmaceutical Sciences* 101 (1): 373–80. <https://doi.org/10.1002/jps.22730>.
- Mosmann, Tim. 1983. "Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays". *Journal of Immunological Methods* 65 (1): 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).
- Murphy, Kate T., Mohammed I. Hossain, Kristy Swiderski, Annabel Chee, Timur Naim, Jennifer Trieu, Vanessa Haynes, et al. 2019. "Mas Receptor Activation Slows Tumor Growth and Attenuates Muscle Wasting in Cancer". *Cancer Research* 79 (4): 706–19. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-1207>.
- Naghavi, Mohsen, Amanuel Alemu Abajobir, Cristiana Abbafati, Kaja M Abbas, Foad Abd-Allah, Semaw Ferede Abera, Victor Aboyans, et al. 2017. "Global, Regional, and National Age-Sex Specific Mortality for 264 Causes of Death, 1980–2016: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2016". *The Lancet* 390 (10100): 1151–1210. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)32152-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)32152-9).

- Overwijk, Willem W., e Nicholas P. Restifo. 2001. "B16 as a Mouse Model for Human Melanoma". *Current protocols in immunology / edited by John E. Coligan ... [et al.]* CHAPTER (maio): Unit-20.1. <https://doi.org/10.1002/0471142735.im2001s39>.
- Paquet, J. L., M. Baudouin-Legros, G. Brunelle, e P. Meyer. 1990. "Angiotensin II-Induced Proliferation of Aortic Myocytes in Spontaneously Hypertensive Rats". *Journal of Hypertension* 8 (6): 565–72. <https://doi.org/10.1097/00004872-199006000-00010>.
- Peach, M J. 1977. "Renin-angiotensin system: biochemistry and mechanisms of action." *Physiological Reviews* 57 (2): 313–70. <https://doi.org/10.1152/physrev.1977.57.2.313>.
- Pei, Nana, Renqiang Wan, Xinglu Chen, Andrew Li, Yanling Zhang, Jinlong Li, Hongyan Du, et al. 2016. "Angiotensin-(1-7) Decreases Cell Growth and Angiogenesis of Human Nasopharyngeal Carcinoma Xenografts". *Molecular Cancer Therapeutics* 15 (1): 37–47. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-14-0981>.
- Petruzzelli, Michele, e Erwin F. Wagner. 2016. "Mechanisms of Metabolic Dysfunction in Cancer-Associated Cachexia". *Genes & Development* 30 (5): 489–501. <https://doi.org/10.1101/gad.276733.115>.
- Petty, W. J., A. A. Miller, T. P. McCoy, P. E. Gallagher, E. A. Tallant, e F. M. Torti. 2009. "Phase I and Pharmacokinetic Study of Angiotensin-(1-7), an Endogenous Antiangiogenic Hormone". *Clinical Cancer Research* 15 (23): 7398–7404. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-1957>.
- Puck, T. T., e P. I. Marcus. 1956. "Action of X-Rays on Mammalian Cells". *The Journal of Experimental Medicine* 103 (5): 653–66. <https://doi.org/10.1084/jem.103.5.653>.
- Rebecca, Vito W., Rajasekharan Somasundaram, e Meenhard Herlyn. 2020a. "Pre-Clinical Modeling of Cutaneous Melanoma". *Nature Communications* 11 (1): 2858. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15546-9>.
- . 2020b. "Pre-Clinical Modeling of Cutaneous Melanoma". *Nature Communications* 11 (1): 2858. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15546-9>.
- Rodgers, Kathleen E., Jamie Oliver, e Gere S. diZerega. 2006. "Phase I/II Dose Escalation Study of Angiotensin 1-7 [A(1-7)] Administered before and after Chemotherapy in Patients with Newly Diagnosed Breast Cancer". *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 57 (5): 559–68. <https://doi.org/10.1007/s00280-005-0078-4>.
- Rupert, Joseph E., Leonidas G. Koniaris, e Teresa A. Zimmers. 2019. "Multimodal Action of Mas Activation for Systemic Cancer Cachexia Therapy". *Cancer Research* 79 (4): 699–700. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-3910>.
- Santos, Robson A. S., Ana C. Simoes e Silva, Christine Maric, Denise M. R. Silva, Raquel Pillar Machado, Insa de Buhr, Silvia Heringer-Walther, et al. 2003. "Angiotensin-(1-7) Is an Endogenous Ligand for the G Protein-Coupled Receptor Mas". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (14): 8258–63. <https://doi.org/10.1073/pnas.1432869100>.
- Shinohara, Tokuyuki, Masataka Harada, Kazuhiro Ogi, Minoru Maruyama, Ryo Fujii, Hideyuki Tanaka, Shoji Fukusumi, et al. 2004. "Identification of a G Protein-Coupled Receptor Specifically Responsive to  $\beta$ -Alanine". *Journal of Biological Chemistry* 279 (22): 23559–64. <https://doi.org/10.1074/jbc.M314240200>.
- Silva, Mário Morais, Fernando Pedro de Souza-Neto, Itamar Couto Guedes de Jesus, Gleisy Kelly Gonçalves, Melissa de Carvalho Santuchi, Bruno de Lima Sanches, Thaís Cristina de Alcântara-Leonídio, et al. 2021. "Alamandine improves cardiac remodeling induced by transverse aortic constriction in mice". *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 320 (1): H352–63. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00328.2020>.

- Smith, Gary Robert, e Sotiris Missailidis. 2004. "Cancer, inflammation and the AT1 and AT2 receptors". *Journal of Inflammation* 1 (1): 3. <https://doi.org/10.1186/1476-9255-1-3>.
- Soto-Pantoja, D. R., J. Menon, P. E. Gallagher, e E. A. Tallant. 2009. "Angiotensin-(1-7) Inhibits Tumor Angiogenesis in Human Lung Cancer Xenografts with a Reduction in Vascular Endothelial Growth Factor". *Molecular Cancer Therapeutics* 8 (6): 1676–83. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-09-0161>.
- Soto-Pantoja, D. R., W. Petty, P. E. Gallagher, e E. Tallant. 2009. "Angiotensin-(1-7) Inhibits Triple Negative Tumor Growth through the Inhibition of Angiogenesis and a Reduction in Placental Growth Factor PlGF." *Cancer Research* 69 (2 Supplement): 901. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.SABCS-901>.
- Souza-Neto, Fernando Pedro de, Mario de Moraes e Silva, Melissa de Carvalho Santuchi, Thaís Cristina de Alcântara-Leonídio, Daisy Motta-Santos, Aline Cristina Oliveira, Marcos Barrouin Melo, et al. 2019. "Alamandine attenuates arterial remodelling induced by transverse aortic constriction in mice". *Clinical Science* 133 (5): 629–43. <https://doi.org/10.1042/CS20180547>.
- Stevenson, Eric J., Alan Koncarevic, Paul G. Giresi, Robert W. Jackman, e Susan C. Kandarian. 2005. "Transcriptional profile of a myotube starvation model of atrophy". *Journal of Applied Physiology* 98 (4): 1396–1406. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.01055.2004>.
- Strawn, William B., Carlos M. Ferrario, e E. Ann Tallant. 1999. "Angiotensin-(1–7) Reduces Smooth Muscle Growth After Vascular Injury". *Hypertension* 33 (1): 207–11. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.33.1.207>.
- Sung, Hyuna, Jacques Ferlay, Rebecca L. Siegel, Mathieu Laversanne, Isabelle Soerjomataram, Ahmedin Jemal, e Freddie Bray. 2021. "Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries". *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 71 (3): 209–49. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>.
- Tallant, E. Ann, Carlos M. Ferrario, e Patricia E. Gallagher. 2005. "Angiotensin-(1–7) Inhibits Growth of Cardiac Myocytes through Activation of the Mas Receptor". *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 289 (4): H1560–66. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00941.2004>.
- Tan, B H L, D A C Deans, R J E Skipworth, J A Ross, e K C H Fearon. 2008. "Biomarkers for Cancer Cachexia: Is There Also a Genetic Component to Cachexia?" *Support Care Cancer*, 7.
- Tisdale, Michael J. 2009. "Mechanisms of Cancer Cachexia". *Physiol Rev* 89: 30.
- Touyz, R. M., e C. Berry. 2002. "Recent Advances in Angiotensin II Signaling". *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 35 (setembro): 1001–15. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2002000900001>.
- Voltarelli, Fabrício A., Fernando T. Frajacomo, Camila de Souza Padilha, Mayra T. J. Testa, Paola S. Cella, Diogo F. Ribeiro, Donizete X. de Oliveira, et al. 2017. "Syngeneic B16F10 Melanoma Causes Cachexia and Impaired Skeletal Muscle Strength and Locomotor Activity in Mice". *Frontiers in Physiology* 8 (setembro): 715. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00715>.
- Wan, Huanying. 2011. "Angiotensin-(1-7) Inhibits the Migration and Invasion of A549 Human Lung Adenocarcinoma Cells through Inactivation of the PI3K/Akt and MAPK Signaling Pathways". *Oncology Reports*, novembro. <https://doi.org/10.3892/or.2011.1554>.
- Wegman-Ostrosky, Talia, Ernesto Soto-Reyes, Silvia Vidal-Millán, e José Sánchez-Corona. 2015. "The Renin-Angiotensin System Meets the Hallmarks of Cancer". *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System* 16 (2): 227–33. <https://doi.org/10.1177/1470320313496858>.
- Yang, Rui, Ilse Smolders, Patrick Vanderheyden, Heidi Demaegdt, Ann Van Eeckhaut, Georges Vauquelin, Aneta Lukaszuk, et al. 2011. "Pressor and Renal Hemodynamic Effects of the Novel

Angiotensin A Peptide Are Angiotensin II Type 1A Receptor Dependent". *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)* 57 (5): 956–64. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.161836>.

Yoshida, Tadashi, e Patrice Delafontaine. 2015. "Mechanisms of Cachexia in Chronic Disease States". *The American Journal of the Medical Sciences* 350 (4): 250–56. <https://doi.org/10.1097/MAJ.0000000000000511>.

Yoshida, Tadashi, A. Michael Tabony, Sarah Galvez, William E. Mitch, Yusuke Higashi, Sergiy Sukhanov, e Patrice Delafontaine. 2013. "Molecular Mechanisms and Signaling Pathways of Angiotensin II-Induced Muscle Wasting: Potential Therapeutic Targets for Cardiac Cachexia". *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 45 (10): 2322–32. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.05.035>.