SARCOPENIA ASSOCIADA AO CÂNCER DE CÓLON: ESTUDO EXPERIMENTAL COM ÊNFASE EM EXPRESSÃO GÊNICA E ALTERAÇÕES MUSCULARES

Tatiana Azevedo da Silva Guimarães[1], Diogo Alexandre Estigarribia Prianti[1], Paola Sanches Cella[2], Thais Camargo Prestes[3], Rafael Deminice[1,]

[1] Universidade Estadual de Londrina -UEL
[2] Universidade Estadual do Norte do Paraná – UENP
[3] Centro Universitário Filadélfia - UNIFIL

RESUMO

A sarcopenia, caracterizada pela perda de massa e função muscular, está associada a pior prognóstico em pacientes com câncer de cólon. Com objetivo de investigar os mecanismos dessa condição, este estudo experimental avaliou a efetividade do modelo de carcinogênese AOM/DSS em 19 camundongos machos C57BL/6. O grupo câncer de cólon induzido (CC; n=9) recebeu AOM seguido de ciclos de DSS, enquanto o grupo controle (C; n=10) não recebeu tratamento. Os animais do grupo CC apresentaram significativa atrofia muscular (14,2%) no músculo sóleo, além de pior desempenho funcional, evidenciado por reduções na força dinâmica (72,7%), força estática (13%) e performance física (31,9%). A análise da expressão gênica no músculo gastrocnêmio demonstrou alterações em genes relacionados à inflamação e à proteólise (Mmp9, Tgfb1, Akt2), sugerindo alterações metabólicas e degradação da matriz extracelular. Conclui-se que o modelo AOM/DSS é valido para reproduzir alterações musculares e moleculares características da sarcopenia associada ao câncer de cólon.

Palavras-chave: Atrofia muscular; Carcinogênese colorretal; Inflamação intestinal; Modelo AOM/DSS; Sarcopenia.

1. INTRODUÇÃO

O câncer de cólon pode ter como precursor mutações em proto-oncogenes ou em genes supressores de tumor, que podem ser adquiridos no decorrer da vida ou herdadas geneticamente (BERGSTROM et al., 2016). Em geral, inicia-se por um acúmulo de células epiteliais não cancerosas na mucosa, que promovem o crescimento e a proliferação celular, que podem crescer lentamente ao longo de 10 a 20 anos antes de se tornarem câncer. (KHEIRELSEID et al., 2013; KUIPERS et al., 2015; RAWLA, et al., 2019).

Embora a predisposição genética desempenhe um papel na carcinogênese colorretal, a maioria dos casos esporádicos está associada a fatores ambientais e modificáveis, como padrões dietéticos inadequados, sedentarismo, obesidade, consumo de álcool, tabaco e disbiose da microbiota intestinal (BOARDMAN et al. 2020), os quais exercem um impacto significativo

sobre o risco populacional e estão associados a desfechos clínicos adversos, incluindo maior incidência e mortalidade do câncer de cólon (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2022; CLINTON, et al.2020).

Uma condição que impacta o CC é a sarcopenia, caracterizada pela perda progressiva e generalizada de massa muscular esquelética, confirmada pela redução da força, quantidade muscular e do desempenho físico (CRUZ-JENTOFT, et al., 2019). A prevalência de sarcopenia durante a terapia neoadjuvante em pacientes com câncer de cólon é de cerca de 50% (LUO et al., 2024). Pacientes pré-operatórios sarcopênicos apresentam risco 30% a 40% maior de complicações graves e recuperação pós-operatória mais lenta, incluindo maior morbidade, infecções, internações prolongadas e mortalidade elevada (SIMONSEN et al. 2018). A longo prazo, a sarcopenia constitui um fator prognóstico negativo para a sobrevida. (SUN et al. 2018).

Para investigar os mecanismos fisiopatológicos e moleculares relacionados à perda muscular associados à inflamação e à progressão tumoral, modelos pré-clínicos são amplamente utilizados. O modelo AOM/DSS é o mais utilizado para estudos de câncer associado a inflamação intestinal, devido a sua semelhança com características histológicas e moleculares humanas, sendo um método barato, fácil e simples de reproduzir (DZHALILOVA, et al. 2023). O azoximetano (AOM) é um procarcinogênico que induz mutações no epitélio intestinal, enquanto o dextrano sulfato de sódio (DSS) é um pró-inflamatório utilizado para induzir colite aguda e crônica. (PARANG, et al. 2016).

Nesse contexto, ainda existem lacunas sobre como a sarcopenia influencia a progressão tumoral no CC. Portanto, compreender a interação entre sarcopenia e carcinogênese intestinal é essencial para desenvolver estratégias terapêuticas mais eficazes. O presente estudo teve como objetivo avaliar a efetividade do modelo AOM/DSS para estudar sarcopenia associada ao CC, com enfoque na análise de alterações musculares e na expressão de genes relacionados à inflamação e a degradação muscular.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Dezenove camundongos machos C57/BL/6, foram mantidos em condições controladas, incluindo um ciclo de luz/escuro de 12/12 horas, temperatura de 23 °C e acesso

irrestrito à ração e água. Os animais foram aleatoriamente divididos em dois grupos: controle (C, n = 10) e câncer de colón (CC, n = 09). Todos os procedimentos foram realizados em conformidade com as diretrizes e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Londrina (nº 032.2023).

O protocolo para o grupo câncer de cólon consistiu em uma única injeção de AOM (i.p. 12,5 mg/kg), seguida, após uma semana, pela administração de DSS (2,0%) na água de beber por cinco dias consecutivos. Este ciclo de DSS foi repetido por três vezes, com um intervalo de 15 dias entre eles. O grupo controle, por sua vez, recebeu apenas água potável durante todo período de 12 semanas, ao final, todos os animais foram eutanasiados.

As capacidades físicas dos camundongos foram avaliadas por meio de três testes específicos. A força estática foi mensurada usando um dinamômetro, através do teste de tração. A força dinâmica, determinada por um teste de escalada em escada, onde os animais realizavam escaladas consecutivas carregando um peso preso à cauda. Por último, a capacidade cardiorrespiratória foi avaliada por um teste de velocidade em esteira. Este teste se iniciava a 10 m/min, com incrementos de 3 m/min a cada 2 minutos, até que o animal atingisse a exaustão ou a velocidade máxima de 28 m/min. A exaustão foi definida como a permanência do animal por 10 segundos abaixo de uma linha pré-determinada na esteira.

Analisamos os músculos EDL e sóleo para determinação da área de secção transversa. Segmentos do cólon, corados com hematoxilina e eosina para a identificação de alterações em relação a forma do lúmen e espessamento epitelial.

A determinação da expressão de mRNA, foi a partir de 50 mg de músculo gastrocnêmio, por meio da técnica de qPCR utilizando um card customizado contendo 96 ensaios de expressão gênica TaqMan® (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) customizado foi utilizado para determinação de genes relacionados a miopatias.

As análises estatísticas foram realizadas no GraphPad Prism 8®. A normalidade dos dados foi verificada com o teste de Shapiro-Wilk. Para dados paramétricos, utilizou-se o teste t Student; já para dados não normais, aplicou-se o teste de Mann-Whitney. O nível de significância estatística foi definido em $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

A Figura 1 reúne os achados relacionados ao impacto da indução da doença no peso corporal dos animais. A indução com AOM/DSS resultou em redução do comprimento do cólon (C: 9,33 cm ± 0,82 vs. CC: 8,22 cm ± 0,87; *P<0,05*; Fig. 1A e B), presença de lesões histopatológicas compatíveis com células neoplásicas e inflamação (1C). Em relação ao peso corporal, embora o grupo CC tenha apresentado menor ganho em comparação ao controle, não foi observada perda significativa de peso (Fig. 1D e E). O consumo de ração foi maior no grupo CC em comparação ao grupo controle (C:3,34 g ± 0,20 vs CC: 7,64 cm ± 1,02 *P<0,05*) (1F e G).

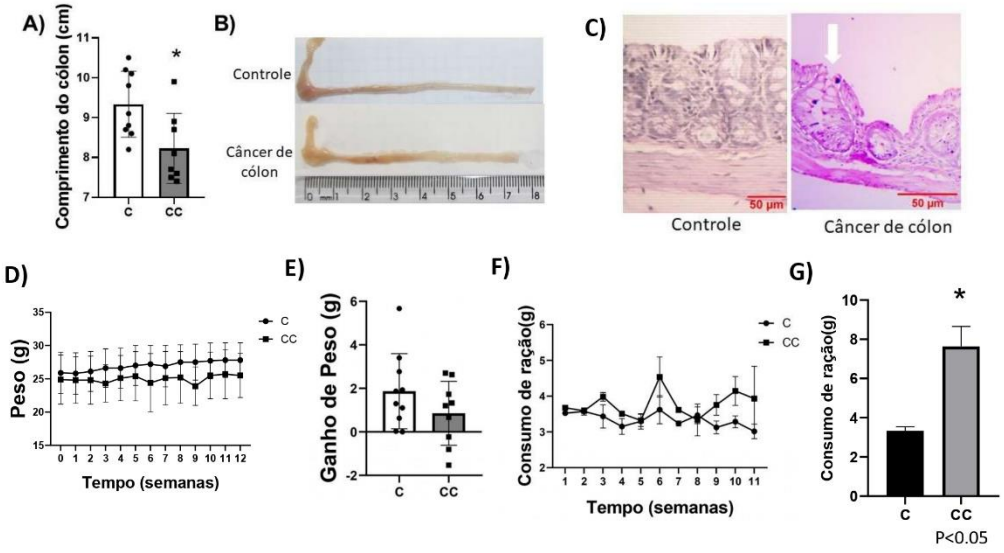


Figura 1. Avaliação do Peso, Composição Corporal e Morfologia do colón. (A) Tamanho do cólon. (B) Fotografia mostrando o cólon de ambos os grupos. (C) Lesão pré-neoplásica. (D) Variação de peso ao longo do protocolo. (E) Diferença de peso dos animais. (F) Consumo de ração ao longo do protocolo. (G) Diferença do consumo de ração.

A Figura 2 detalha os efeitos da administração de AOM/DSS, mostrando o desenvolvimento de sarcopenia e a redução na aptidão física dos animais. Observou-se uma redução significativa na força muscular dinâmica de 149% (C: 8,87 g vs. CC: -4,34 g, *P<0.05)* .2 A), e estática de 13% em relação ao grupo controle (C:65,6 g vs. CC:57,1 g, *P<0.05*) (2 B). O modelo também promoveu redução da performance física do grupo CC demonstrada pelo teste de esforço em esteira rolante de 31,9% (C: 257,8 m vs. CC: 175,4 m, *P<0.05*) (2 C). O grupo CC também apresentou e atrofia no diâmetro das miofibrilas do musculo EDL (5,67%,

C:299 µm2 vs CC:216 µm2, *P<0.05*) (2 D) e o sóleo (14,2%, C:460 µm2 vs CC:394 µm2, *P<0.05*) (2 E). Houve um aumento na degradação da matriz celular (Mmp9), na ativação de vias inflamatórias (Tgfb1) e na alteração metabólica muscular (AKT2) (2 F).

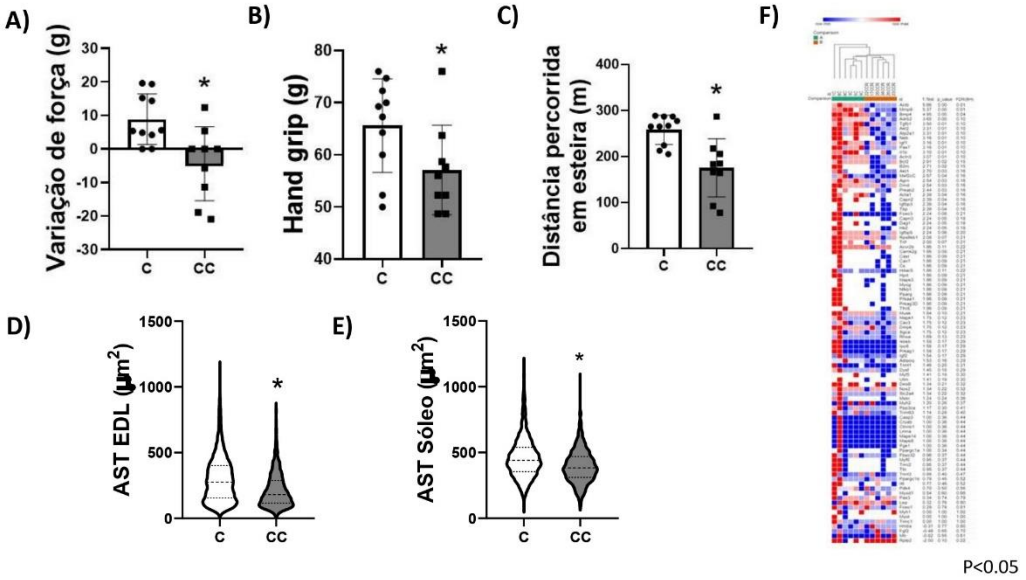


Figura 2. Impacto do modelo de câncer de cólon nos parâmetros de sarcopenia. (A) Redução da força de escalada. (B) Redução da força de preensão. (C) Diminuição da distância percorrida na esteira. (D) Atrofia das fibras do músculo sóleo. (E) Atrofia das fibras do músculo EDL (F). Alterações na expressão de genes associados à inflamação e proteólise.

4. DISCUSSÃO

Os nossos resultados evidenciam uma redução significativa na resistência muscular e na capacidade cardiorrespiratória, avaliadas pelos testes de 1RM, força de pressão e desempenho em esteira. Estudos com modelos murinos também descrevem achados semelhantes, incluindo redução na área das fibras musculares dos tipos I e II, respectivamente nos músculos sóleo e EDL – alteração igualmente observada em pacientes com sarcopenia (CICILIOT, et al.,2013).

A análise de expressão gênica no músculo gastrocnêmio dos animais do grupo CC por meio de qPCR, a qual revelou alterações compatíveis com o quadro observado de perda muscular. A análise relevou dois eixos principais de resposta muscular. O eixo inflamatório **(**IL-1 1β/TGF-β1/MMP-9) indica um microambiente pró-inflamatório e pró-fibrótico, no qual a ativação de citocinas estimula fibrose, degradação da matriz extracelular e comprometimento da regeneração, resultando em atrofia muscular (GARG et al., 2010 ;

HUANG, et al., 2017; KANAI, et al., 2024). Em contrapartida, o eixo adaptativo/anabólico (ADRB2/AKT2) é um mecanismo compensatório, com ativação de vias que estimulam síntese proteica, hipertrofia e inibição de proteólise, possivelmente como forma de preservar a massa e função muscular (YANG, et al., 2020; SASAKO, et al., 2022 KANAI, et al., 2024).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O modelo experimental AOM/DSS, mostrou-se eficaz na indução de sarcopenia, resultando em perda funcional, através da redução da força e da capacidade cardiorrespiratória, e atrofia muscular. A análise molecular confirmou um estado catabólico, caracterizado por alterações nas vias de proteólise, inflamação e anabolismo muscular, similar à sarcopenia em contextos inflamatórios como o câncer de cólon.

REFERÊNCIAS

BERGSTROM, K.; LIU, X.; ZHAO, Y. et al. **Defective Intestinal Mucin-Type O-Glycosylation Causes Spontaneous Colitis-Associated Cancer in Mice**. Gastroenterology. 2016. Disponível em: doi:10.1053/j.gastro.2016.03.039. Acesso em: 21 mar 2025.

BOARDMAN, L. A.; VILAR, E.; YOU, Y. N.; SAMADDER, J. AGA **Clinical Practice Update on Young Adult-Onset Colorectal Cancer Diagnosis and Management: Expert Review. Clinical Gastroenterology and Hepatology,** Volume 18, Issue 11, 2415 – 2424. 2020. Disponível em:doi.org/10.1016/j.cgh.2020.05.058. Acesso em: 12 mar.2025.

CICILIOT, S.; ROSSI, A.C. DYAR, K.A. et al. **Muscle type and fiber type specificity in muscle wasting.** Int J Biochem Cell Biol. 2013. Disponível em: doi:10.1016/j.biocel.2013.05.016. Acesso em: 21 mar 2025.

CLINTON, SK. Et al. The World **Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research Third Expert Report on Diet, Nutrition, Physical Activity, and Cancer: Impact and Future Directions**. J Nutr. 2020.Disponível em: doi:10.1093/jn/nxz268. Acesso em 07 agost. 2025.

CRUZ-JENTOFT, A. J. et al. **Sarcopenia: revised European consensus on definition and diagnosis.** Age and Ageing, 2019. Disponível em: doi.org/10.1093/ageing/afy169. Acesso em: 17 mar. 2025.

DZHALILOVA, D. et al. **Murine Models of Colorectal Cancer: The Azoxymethane (AOM)/Dextran Sulfate Sodium (DSS) Model of Colitis-Associated Cancer**. PeerJ, 2023. Disponível em: 10.7717/peerj.16159. Acesso em: 02 abr. 2025.

GARG, P. et al. **Matrix metalloproteinase-9 functions as a tumor suppressor in colitis-associated cancer.** Cancer research, 2010. Disponível em: 10.1158/0008-5472. Acesso em: 17 agost. 2025.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil). **Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2022. 160 p. ISBN 978-65-88517-09-3 Disponível em: https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/estimativa-2023-incidencia- de-cancer-no-brasil. Acesso em: 09 mar. 2025.

KANAI, M.; GANBAATAR, B.; ENDO, I. et al. **Inflammatory Cytokine-Induced Muscle Atrophy and Weakness Can Be Ameliorated by an Inhibition of TGF-β-Activated Kinase-1.** Int J Mol Sci. 2024. Disponível em:10.3390/ijms25115715. Acesso em: 01 jul. 2025.

KHEIRELSEID, E. A.; MILLER, N.; CHANG, K. H. et al. **Mismatch repair protein expression in colorectal cancer**. J Gastrointest Oncol. 2013. Disponível em: doi:10.3978/j.issn.2078-6891.2013.021. Acesso em: 10 abr. 2025.

KUIPERS, E. J.; GRADY, W. M.; LIEBERMAN, D. et al. **Colorectal cancer**. Nat Ver Dis Primers, 2015. Disponível em: https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.65. Acesso em: 01 abr. 2025.

LUO, L. et al. **Prevalence and Clinical Outcomes of Sarcopenia in Patients with Esophageal, Gastric or Colorectal Cancers Receiving Preoperative Neoadjuvant Therapy: A Meta-Analysis**. Asia Pac J Oncol Nurs, v. 11, n. 4, p. 100436, 2024. Disponível em: doi:10.1016/j.apjon.2024.100436. Acesso em: 28 mar. 2025.

PARANG, B.; BARRETT, C. W.; WILLIAMS, C. S. **AOM/DSS model of colitis-associated cancer**. Methods Mol Biol, v. 1422, p. 297–307, 2016. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3603-8_26. Acesso em: 21 mar. 2025.

RAWLA, P.; SUNKARA, T.; BARSOUK, A. **Epidemiology of colorectal cancer: incidence, mortality, survival, and risk factors**. Gastroenterology Review/ Przegląd Gastroenterologiczny.2019. Disponível em:doi.org/10.5114/pg.2018.81072. Acesso em: 21 mar. 2025.

SASAKI, T.; UMEHARA, T.; SOEDA, K. et al**. Deletion of skeletal muscle Akt1/2 causes osteosarcopenia and reduces lifespan in mice.** Nat Commun. 2022.Disponível em: 10.1038/s41467-022-33008-2. Acesso em: 20 jul. 2025.

SIMONSEN, C.et al. **Sarcopenia and Postoperative Complication Risk in Gastrointestinal Surgical Oncology: A Meta-Analysis**. Ann Surg, v. 268, n. 1, p. 58- 69, 2018. Disponível em: doi:10.1097/SLA.0000000000002679. Acesso em: 26 mar.2025

SUN, G. et al. **Can sarcopenia be a predictor of prognosis for patients with non-metastatic colorectal cancer? A systematic review and meta-analysis**. International Journal of Colorectal Disease. Int J Colorectal Dis.2018. Disponível em:10.1007/s00384-018-3128-1. Acesso em: 28 mar.2025

YANG W.; HUANG, J.; WU, H.et al. Molecular mechanisms of cancer cachexia induced muscle atrophy (Review). Mol Med Rep. 2020. Disponível em:10.3892/mmr.2020.11608. Acesso em: 10 agost. 2025.